



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**‘MULTIFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE  
TITANIO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y  
BIOMOLECULAS PARA MEJORAR EL DESEMPEÑO  
DE DISPOSITIVOS IMPLANTABLES’**

---

**Tesista: Lic. Fiorela Ghilini**

**Directora: Dra. Patricia Schilardi**

**Año: 2020**



*El presente Trabajo de Tesis para acceder al grado de doctora de la Facultad de Ciencias Exactas se realizó en el grupo NanosBio del Laboratorio de Nanoscopías y Fisicoquímica de Superficies del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), bajo la dirección de la Dra. Patricia L. Schilardi*



*“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy  
lejos”*

*El Principito, Antoine de Saint-Exupéry.*



## Resumen

Al incorporar un material artificial dentro del organismo, en el primer contacto con los fluidos biológicos, las biomoléculas se adhieren al material, creando una nueva interfaz entre dicho material y el sistema vivo. Esta interfaz condiciona dos eventos posteriores: la adhesión celular, deseable en el caso de implantes que deban incorporarse de manera permanente (ortopédicos o dentales) e indeseable en el caso de materiales que deban, ser eliminados posteriormente (por ejemplo, clavos ortopédicos); y la adhesión de microorganismos, que puede originarse en bacterias ya presentes en el individuo o bacterias que hayan ingresado por contaminación del material o manipulación inapropiada durante el proceso quirúrgico. La modificación del biomaterial en la nanoescala a través de la funcionalización de su superficie con biomoléculas permitiría controlar estos eventos, asegurando el éxito del procedimiento.

El objetivo de esta tesis fue diseñar estrategias de que conduzcan a obtener superficies multifuncionalizadas con biomoléculas reguladoras de la interacción célula/material y con nanopartículas de plata (AgNPs) como agente antimicrobiano, así como la caracterización fisicoquímica acabada de estos sistemas y la evaluación de su performance en el entorno biológico para las que fueron diseñadas.

Se logró la inmovilización de AgNPs sobre titanio mediada por poli-L-lisina (PLL), un polímero del aminoácido L-lisina. Se analizó la capacidad antimicrobiana y la biocompatibilidad y se compararon con las de un sustrato de titanio con AgNPs sin la presencia de PLL. Se encontró que la superficie con PLL tiene un efecto antimicrobiano mayor (bactericida) que para el caso de las superficies sin PLL (bacteriostático), sin presentar citotoxicidad para células osteoblásticas. Asimismo, se lograron superficies multifuncionalizadas con AgNPs y lactoferrina (Lf), una proteína con propiedades antimicrobianas. Los resultados mostraron que estas superficies tienen capacidad antimicrobiana, a la vez que promueven una mayor adhesión y diferenciación de células osteoblásticas. Ambos sistemas se caracterizaron, además, mediante técnicas fisicoquímicas adecuadas (AFM, FTIR, XPS, SPR, técnicas electroquímicas, etc.).

Por otra parte, se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos de implantes reales recubiertos con AgNPs como parte de un desarrollo tecnológico en colaboración con una empresa nacional.

Los resultados de esta tesis permiten el desarrollo racional de recubrimientos antimicrobianos sobre dispositivos ortopédicos implantables de titanio con el objetivo de disminuir la incidencia de infecciones postoperatorias.





## Agradecimientos

La vida es eso que hacemos para cambiar lo que somos, dijo Galeano.....

Esta etapa culmina y comienza otra con nuevos desafíos, nuevos lugares y nuevas personas por descubrir. Eso es lo lindo de la investigación, nunca es rutinario, siempre hay algo nuevo que probar, hasta es una excusa para divertirse un poco.... Siento que crecí mucho estos años, tanto personal como profesionalmente, y es gracias a mucha gente que me fui encontrando en este camino. Obviamente, también tuvo sus tropezones y caídas, pero eso es parte necesaria del aprendizaje.

En primer lugar quiero agradecerles a mis viejos, por permitirme formarme como profesional y seguir mis sueños. Por darme valores esenciales como la humildad, la bondad y la generosidad, y por despertar en mí esa otra vocación que es la docencia que tanto amo hacer. Gran parte de este logro es gracias a ellos, y agradezco a la vida tenerlos conmigo en este momento. A mis hermanas y hermano, mis hermosas sobrinas y en especial a Veri que me inspira a ser cada vez mejor.

A mi enorme compañero, Alén, por estar siempre con sus consejos y bancarme en cada una de las etapas que fui atravesando a lo largo de estos años. Mi piedra fundamental, mi apoyo incondicional, mi gran amor.

A mis amigos y amigas que la vida me supo dar, aquellos que ya no veo tanto pero me acompañaron en mi carrera, a los que conocí durante el doctorado, y a quienes no entienden nada de lo que hago pero siempre me alentaron (Pau, Emi, Angi, Ro). Maru, mi alma gemela que se me fue lejos pero siempre está conmigo. Ceci y Yami, bellas mujeres de las que aprendo día a día....por esas juntadas que son un cable a tierra, imposibles de coordinar y llenas de risas y pequeños correteando.

Al Inifta, por darme mi lugar de trabajo, pero principalmente por ser el lugar donde conocí tantas hermosas personas: Yami, Ceci, Caro D, Caro V, María Elena, Tati, Mari, Doris, Bel, Fede, Gera, Jime, Sebas, Gabi, Cami, Nati, Fla, Roberto, Anto, Noel.. es un lugar al que siempre quiero volver...

A Patri, por animarse a ser mi directora, tarea difícil, lo sé. Una mujer brillante y sobre todo de enorme calidad humana, excelente persona y profesional. Aprendí muchísimo de ella en lo personal y en lo científico, a nunca bajar los brazos y seguir insistiendo que todo llega. Gracias eternas

A Diego, gran amigo y compañero. Siempre ahí para oír mis berrinches y darme sus valiosos consejos. Claramente una persona fundamental sin la cual no hubiera podido llegar tan lejos. Un excelente científico y un gran ser humano.

A mi grupete NanosBio, Caro D, Irene y Ale con sus mates reparadores y charlas descontracturadas. Siempre listos y listas para escuchar y darme una mano cuando lo necesité. A Nati por su gran ayuda con las células y los protocolos, por la paciencia y la dedicación.

A la Universidad pública por formarme con tanta calidad, a la Facultad de Cs. Exactas por permitirme hacer el Doctorado en esa Casa de Estudios. Porque como dijo Simón Bolívar, un pueblo ignorante es un instrumento ciego de su propia destrucción, y la educación pública nos construye como seres críticos y responsables.

A Conicet, UNLP y ANPCyT, por otorgarme la beca y los subsidios que financiaron este trabajo.

Infinitas gracias

Fio



## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	15
ABREVIACIONES .....	19
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>21</b>
1.1 DISPOSITIVOS IMPLANTABLES EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA .....	23
1.2 LOS BIOMATERIALES .....	23
1.2.1 <i>Titanio</i> .....	24
1.3 INFECCIONES EN DISPOSITIVOS IMPLANTABLES .....	26
1.3.1 <i>El Biofilm: descripción y desarrollo</i> .....	27
1.4 <i>Nuevas estrategias para erradicar biofilms</i> .....	30
1.4.1 <i>Nanopartículas de plata</i> .....	30
1.4.2 <i>Funcionalización de superficies con aplicaciones en biomedicina</i> .....	34
1.4.2.1 <i>Superficies antimicrobianas</i> .....	35
1.5 SUPERFICIES MULTICOMPONENTES.....	37
1.5.1 <i>Inmovilización de Biomoléculas</i> .....	37
1.6 OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS .....	38
1.6 BIBLIOGRAFÍA .....	40
<b>CAPÍTULO 2: .....</b>	<b>49</b>
<b>TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>FISICOQUÍMICA .....</b>	<b>49</b>
2.1 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE SUPERFICIES.....	51
2.1.1 <i>Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)</i> .....	51
2.1.1.1 <i>Estilos de cantiléver:</i> .....	56
2.1.1.2 <i>Modos de operación del AFM:</i> .....	57
2.2.1.3 <i>Medidas de Rugosidad superficial</i> .....	60
2.1.2 <i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i> .....	61
2.1.3 <i>Microscopía Electronica (SEM)</i> .....	64
2.1.4 <i>Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)</i> .....	66
2.1.4 <i>Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	70
2.2 OTRAS TÉCNICAS .....	71
2.2.1 <i>Ángulo de contacto:</i> .....	71
2.2.2 <i>Espectroscopía UV- Visible</i> .....	73
2.2.3 <i>Dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial Z</i> .....	75

2.2.4 Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-OES) ....	76
2.2.5 Cuantificación de iones $Ag^+$ con electrodo selectivo de Plata.....	76
2.2.6 Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM).....	79
2.2.7 Cuantificación de proteínas por método de Bradford .....	81
3.1. CULTIVOS BACTERIANOS. ....	89
3.1.1 <i>Staphylococcus</i> .....	89
3.1.2 <i>Pseudomonas</i> .....	90
3.1.3 Conservación de las cepas bacterianas. ....	92
3.1.4 medios de cultivo .....	92
3.2 ANÁLISIS DE BACTERIAS VIABLES .....	93
3.2.1 Determinación de la turbidez: .....	93
3.2.2 Recuento en placa: .....	94
3.2.3 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM).....	95
3.3 FORMACIÓN DE BIOFILMS TEMPRANOS SOBRE SUSTRATOS DE TI .....	95
3.3.1 Recuento en placa de bacterias viables adheridas sobre los sustratos .....	97
3.3.2 Análisis cuali-cuantitativo del biofilm formado sobre los distintos sustratos.....	98
3.3.2.1 Determinación de la viabilidad bacteriana mediante el kit FilmTracer™ LIVE/DEAD®	
Biofilm Viability. ....	98
3.3.2.2 Análisis del material polimérico de la matriz extracelular con el kit FilmTracer SYPRO®	
Ruby Biofilm Matrix Stain.....	99
3.4 CÉLULAS EUCARIOTAS .....	100
3.4.1 Cultivos celulares.....	100
3.4.2 Medios de cultivo.....	100
3.4.3 Tinción con Naranja de Acridina .....	101
3.4.3.1 Adhesión de macrófagos .....	101
3.4.3.2 Adhesión y proliferación de osteoblastos.....	101
3.4.4 Determinación de viabilidad de osteoblastos adheridos .....	102
3.4.5 Diferenciación de osteoblastos.....	103
3.4.5.1 Determinación de fosfatasa alcalina (FAL).....	103
3.4.5.2 Producción de colágeno y mineralización celular como marcadores de diferenciación. .	104
3.5 BIBLIOGRAFÍA .....	105
<b>CAPÍTULO 4: .....</b>	<b>109</b>
<b>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN</b>	
<b>SOBRE TITANIO .....</b>	<b>109</b>
4.2 MÉTODO DE SÍNTESIS DE AGNPs DE DIFERENTES TAMAÑOS.....	113
4.3 ESTABILIDAD DE LAS AGNPs A DIFERENTES PH. ....	122

4.5 ESTUDIOS DE LA ADSORCIÓN DE AGNPs SOBRE Ti .....	123
4.5.1 Adsorción de AgNPs sobre titanio .....	123
4.5.2 Cinética de adsorción mediante microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).....	126
4.6 CONCLUSIONES.....	128
4.7 BIBLIOGRAFÍA .....	129
<b>MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES CON LACTOFERRINA BOVINA Y AGNPs .....</b>	<b>133</b>
5.1 INTRODUCCIÓN.....	135
5.1.2 Descripción de la lactoferrina .....	136
5.2 FUNCIONALIZACIÓN DE AGNPs CON LACTOFERRINA BOVINA.....	141
5.3 CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE AGNPs-LF .....	147
5.4 FUNCIONALIZACIÓN DE Ti/TiO <sub>2</sub> CON LACTOFERRINA Y AGNPs.....	148
5.4.1 Estudios de las propiedades antimicrobianas.....	153
5.4.2 Estudios de la biocompatibilidad de los materiales.....	154
5.5 PROPIEDADES OSTEORREGENERADORAS DE LOS SUSTRATOS DE TITANIO MODIFICADOS CON LF Y AGNPs	158
5.5.1 Evaluación de colágeno y mineralización de la matriz extracelular .....	158
5.5.2 Fosfatasa alcalina como marcador de la diferenciación celular.....	160
5.6 CONCLUSIONES.....	162
5.6 BIBLIOGRAFÍA .....	163
<b>CAPITULO 6: .....</b>	<b>169</b>
<b>ADSORCIÓN DE AGNPs SOBRE TITANIO MEDIADA POR POLI-L-LISINA .....</b>	<b>169</b>
6.1 INTRODUCCIÓN.....	171
6.2 PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN.....	172
6.2.1 Funcionalización de Ti con PLL y AgNPs.....	172
6.2.2 Caracterización superficial de los sustratos obtenidos. ....	173
6.4 ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO .....	180
6.4.1 Recuento de bacterias viables. ....	180
6.5 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS AGNPs ADSORBIDAS Y DE LA LIBERACIÓN DE PLATA. ....	190
6.6 ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS SUSTRATOS Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL-AGNPs .....	192
6.6.1 Adhesión y viabilidad de osteoblastos.....	192
6.6.2 Estudio de proliferación de células eucariotas .....	195
6.7 CONCLUSIONES:.....	197
6.8 BIBLIOGRAFÍA .....	198
<b>CAPÍTULO 7: IMPLANTES FUNCIONALIZADOS CON AGNPs.....</b>	<b>203</b>
<b>CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. ....</b>	<b>203</b>

7.1 INTRODUCCIÓN.....	205
7.1.1 <i>Infecciones asociadas a implantes: prevalencia y consecuencias</i> .....	205
7.1.2 <i>Implantes recubiertos con Plata</i> .....	206
7.2 ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIMICROBIANO EN FUNCIÓN DEL CUBRIMIENTO DE AgNPs. ....	208
7.3 FUNCIONALIZACIÓN DE TORNILLOS Y CLAVOS ENDOMEDULARES DE TITANIO. ....	209
7.3.1 <i>Estabilidad del recubrimiento</i> .....	210
7.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LIBERACIÓN DE Ag <sup>+</sup> .....	210
7.4.1 <i>Liberación de Ag<sup>+</sup> a largo plazo</i> .....	211
7.5 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DISPOSITIVOS MODIFICADOS .....	212
7.6 CONCLUSIONES.....	214
7.7 BIBLIOGRAFÍA.....	215
<b>CONCLUSIONES FINALES: .....</b>	<b>217</b>
APÉNDICE 1 .....	223

## Indice de figuras

<b>Capítulo 1</b>	
Figura 1.1	Pág. 17
Figura 1.2	Pág. 22
Figura 1.3	Pág. 24
Figura 1.4	Pág. 27
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 2.1	Pág. 53
Figura 2.2	Pág. 54
Figura 2.3	Pág. 55
Figura 2.4	Pág. 57
Figura 2.5	Pág. 57
Figura 2.6	Pág. 59
Figura 2.7	Pág. 61
Figura 2.8	Pág. 63
Figura 2.9	Pág. 66
Figura 2.10	Pág. 67
Figura 2.11	Pág. 69
Figura 2.12	Pág. 71
Figura 2.13	Pág. 72
Figura 2.14	Pág. 73
Figura 2.15	Pág. 77
Figura 2.16	Pág. 80
Figura 2.17	Pág. 80
Figura 2.18	Pág. 82
Figura 2.19	Pág. 83
<b>Capítulo 3</b>	
Figura 3.1	Pág. 89
Figura 3.2	Pág. 91
Figura 3.3	Pág. 96
Figura 3.4	Pág. 97
<b>Capítulo 4</b>	
Figura 4.1	Pág. 112
Figura 4.2	Pág. 115

Figura 4.3	Pág. 117
Figura 4.4	Pág. 118
Figura 4.5	Pág. 119
Figura 4.6	Pág. 120
Figura 4.7	Pág. 121
Figura 4.8	Pág. 123
Figura 4.9	Pág. 124
Figura 4.10	Pág. 126

---

### Capítulo 5

---

Figura 5.1	Pág. 137
Figura 5.2	Pág. 139
Figura 5.3	Pág. 141
Figura 5.4	Pág. 142
Figura 5.5	Pág. 143
Figura 5.6	Pág. 144
Figura 5.7	Pág. 144
Figura 5.8	Pág. 145
Figura 5.9	Pág. 147
Figura 5.10	Pág. 148
Figura 5.11	Pág. 149
Figura 5.12	Pág. 151
Figura 5.13	Pág. 151
Figura 5.14	Pág. 152
Figura 5.15	Pág. 154
Figura 5.16	Pág. 155
Figura 5.17	Pág. 157
Figura 5.18	Pág. 157
Figura 5.19	Pág. 159
Figura 5.20	Pág. 159
Figura 5.21	Pág. 161
Figura 5.22	Pág. 161

---

### Capítulo 6

---

Figura 6.1	Pág. 172
Figura 6.2	Pág. 173
Figura 6.3	Pág. 174



Figura 6.4	Pág. 175
Figura 6.5	Pág. 176
Figura 6.6	Pág. 177
Figura 6.7	Pág. 177
Figura 6.8	Pág. 179
Figura 6.9	Pág. 182
Figura 6.10	Pág. 183
Figura 6.11	Pág. 184
Figura 6.12	Pág. 185
Figura 6.13	Pág. 186
Figura 6.14	Pág. 187
Figura 6.15	Pág. 188
Figura 6.16	Pág. 188
Figura 6.17	Pág. 190
Figura 6.18	Pág. 191
Figura 6.19	Pág. 193
Figura 6.20	Pág. 194
Figura 6.21	Pág. 195
Figura 6.22	Pág. 196

---

## Capítulo 7

---

Figura 7.1	Pág. 208
Figura 7.2	Pág. 209
Figura 7.3	Pág. 211
Figura 7.4	Pág. 213



## Abreviaciones

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFM</b>	Microscopía de Fuerzas Atómicas
<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de Plata
<b>CA</b>	Ángulo de Contacto
<b>CIM</b>	Concentración Inhibitoria Mínima
<b>CN</b>	Caldo Nutritivo
<b>D.O</b>	Densidad Óptica, relacionada con la masa bacteriana
<b>DLS</b>	Dispersión Dinámica de la Luz
<b>EPS</b>	Material polimérico extracelular, del inglés: <i>Extracellular Polymeric Substances</i>
<b>FTIR</b>	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
<b>FTIR-ATR</b>	Espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada
<b>GPa</b>	Giga Pascal
<b>ICP-OES</b>	Espectrometría de emisión óptica con Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>LbL</b>	Capa por capa, del inglés: <i>Lyer by Lyer</i>
<b>Lf</b>	Lactoferrina
<b>LPS</b>	Lipo-polisacárido bacteriano
<b>N</b>	Newtons
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato salino pH: 7,4
<b>PLL</b>	Poli- L- Lisina
<b>QCM</b>	Microbalanza de Cristal de Cuarzo
<b>Ra</b>	Rugosidad promedio
<b>RGD</b>	Tripéptido: Arginina, Glicina y Aspartato
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>Rq</b>	Rugosidad cuadrática media
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. epidermidis</i></b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b><i>S. sanguinis</i></b>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<b>SEM</b>	Microscopio Electrónico de Barrido

<b>SPM</b>	Microscopía de barrido por Sondas
<b>SPR</b>	Resonancia de Plasmón Superficial
<b>SSI</b>	Infección en el sitio quirúrgico, del inglés: <i>Surgical Site Infection</i>
<b>STM</b>	Microscopía de Efecto Túnel
<b>TEM</b>	Microscopio de Transmisión
<b>Ti</b>	Titanio
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonias
<b>V</b>	Volts
<b>XPS</b>	Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

# Capítulo 1:

## Introducción general

*"Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico-tecnológico, y los países pobres lo siguen siendo porque no lo hacen. La ciencia no es cara, cara es la ignorancia". Bernardo Houssay*



## **1.1 Dispositivos implantables en cirugía ortopédica**

La incorporación al cuerpo de materiales extraños en forma de tornillos, alambres, clavos, pinzas y/o prótesis en general, para mantener los huesos dañados en su alineación adecuada o para reemplazar hueso dañado o tejido conectivo, es una práctica quirúrgica generalizada para mejorar la calidad de vida del paciente [1]. En los últimos tiempos se han logrado grandes mejoras en los materiales disponibles, permitiendo que los cirujanos puedan restaurar de forma más precisa las partes dañadas y devolverlas a sus rangos de movimiento original. Sin embargo, estas funciones pueden verse comprometidas debido a diversos factores potenciales [2], entre los cuales el más importante es la aparición de infecciones del sitio quirúrgico (SSI) [3], [4] que ponen en riesgo la supervivencia del implante y, por lo tanto, la calidad de vida del paciente. Como ejemplo, la incidencia de infección en cirugías espinales programadas es de 0,7 a 12% en los casos en los que se realizan instrumentaciones vertebrales. Esta problemática ocasiona numerosas complicaciones: aumento de la morbilidad, complicaciones médicas, mayor tiempo para la resolución del cuadro del paciente, aumento en los costos de salud (laboratorios, imágenes, reintervenciones, medicamentos, etc.) [5],[6]. Es importante destacar que las internaciones prolongadas predisponen al paciente a sufrir infecciones nosocomiales que pueden contribuir a la morbilidad de paciente. [7], [8]. Asimismo, O'Neil *et al* estimaron que para el año 2050 el índice de muerte por infecciones provocadas por microorganismos multi-resistentes a antibióticos superaría al del cáncer [9].

Teniendo en cuenta los efectos negativos asociados a las infecciones postquirúrgicas, es sumamente necesario diseñar estrategias innovadoras para la prevención y tratamiento de infecciones.

## **1.2 Los Biomateriales**

Un biomaterial puede definirse como cualquier material, sintético o natural, que se utiliza en contacto con sistemas biológicos [10]. En general, suelen utilizarse en aplicaciones médicas como dispositivos diseñados para ser implantados o incorporados dentro de un organismo vivo [11], aunque también se utilizan como plataformas de diagnóstico en laboratorio clínico o en genómica, o en la industria biotecnológica, entre otros [10].

El objetivo de un biomaterial empleado como dispositivo médico es reemplazar y/o restaurar una función o una parte de un tejido, por lo que, al tratarse de un material

que va a ser implantado en un organismo vivo, debe cumplir con ciertas características: i) ser biocompatible, ii) no ser tóxico ni carcinógeno, iii) ser químicamente estable, iv) ser inerte, v) tener resistencia mecánica adecuada y vi) ser económico, con propiedades reproducibles y fácil de fabricar. Los biomateriales pueden ser de origen artificial o biológico. En el primer caso se puede mencionar a los materiales metálicos, poliméricos y cerámicos. Los implantes metálicos, junto con sus aleaciones, son los más utilizados para implantes ortopédicos (clavos endomedulares, tornillos, placas, etc) e implantes dentales, ya que deben poseer una gran resistencia al desgaste mecánico y ser capaces de soportar la carga adecuada para cumplir su función. Los metales más usados para la fabricación de estos implantes son: acero inoxidable, aleaciones de cobalto, cromo, molibdeno y níquel, y titanio (Ti) y sus aleaciones con aluminio y vanadio. Entre los biomateriales biológicos o naturales, se encuentran el polvo de hueso, injertos de piel, matriz extracelular y hasta células madres extraídas de humanos o animales. Por su parte, el Ti es uno de los materiales más ampliamente utilizados en implantes debido a sus características: resistencia a la corrosión y al desgaste mecánico, naturaleza inerte, capacidad de adsorber proteínas en su superficie y por su excelente biocompatibilidad [12]. Estas propiedades lo convirtieron en uno de los materiales más elegidos por profesionales de la salud para su uso en implantes ortopédicos, dentales y cardíacos (válvulas)[13].

### **1.2.1 Titanio**

Como se mencionó anteriormente, uno de los materiales más utilizados desde la década del '40 en la fabricación de implantes es el Ti. Éste pertenece a los metales de transición, y, en su forma elemental, presenta un color plateado grisáceo. Además, tiene un alto punto de fusión, bajas conductividades térmica y eléctrica y es paramagnético [14]. La maleabilidad y resistencia del Ti se deben a la combinación de un valor del módulo de Young (relacionado con la elasticidad del material) relativamente alto (~110 GPa) [15] y una dureza promedio de 6 en la escala de Mohs . Estos parámetros son importantes a la hora del diseño de biomateriales implantables, ya que lo ideal es utilizar materiales con valores de estos parámetros similares a los del hueso humano para lograr una adaptación correcta. Las últimas investigaciones en relación al tema se han ocupado en buscar aleaciones que disminuyan el módulo de Young [16] para acercarlo al del hueso humano, o incluso lograr materiales capaces de modificar este parámetro in situ [15].



Por otro lado, es sabido que la superficie del Ti en contacto con el aire o un medio acuoso se encuentra cubierta por una capa de óxido nativo,  $\text{TiO}_2$ , el cual está formado principalmente por un óxido amorfo de unos 20 nm de espesor [17]–[19]. Su punto isoeléctrico es 4.5, por lo tanto, a pH fisiológico ( $\text{pH} \approx 7$ ) esta superficie se encuentra cargada negativamente, exponiendo grupos  $\text{OH}^-$  en la interfase [20].

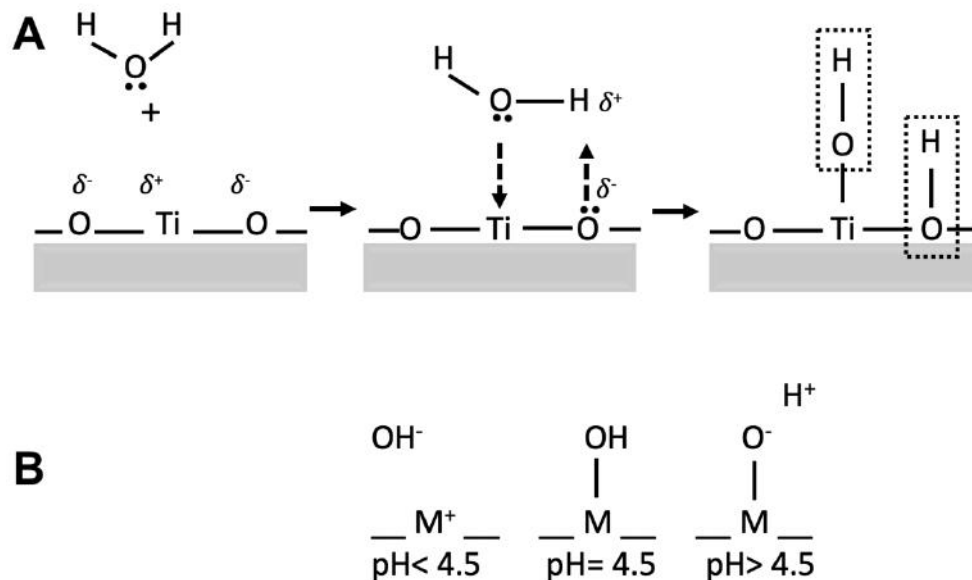


Figura 1.1: A: Proceso de formación de grupos hidroxilo en el óxido superficial. B: disociación en medio acuoso según pH.

Esta particular capa pasivadora de óxido es la que, en definitiva, interacciona con el tejido y el medio circundante, y, al ser poco reactiva, incide favorablemente en la buena biocompatibilidad del metal.

En este trabajo, se aprovechó esta capa pasivante para anclar distintas moléculas a la superficie  $\text{Ti/TiO}_2$  mediante distintas interacciones (covalentes o electrostáticas, según la sustancia), con el fin de proporcionar a dicha superficie una funcionalidad particular.

### **1.3 infecciones en dispositivos implantables**

Al introducirse en el cuerpo un material extraño, las superficies que están en contacto con fluidos biológicos se encuentran en un ambiente propicio para la adhesión y proliferación de bacterias. La presencia de bacterias puede deberse a múltiples factores, tales como bacterias previamente residentes en el organismo, esterilización defectuosa tanto del dispositivo a implantar como de los instrumentos quirúrgicos, manejo inadecuado por parte de personal, contaminación ambiental, etc. Algunas bacterias pueden alojarse en la zona del implante, encontrando allí un nicho adecuado para su proliferación debido a la poca irrigación, una superficie (la del implante) que permite su adhesión y un medio rico en nutrientes.

El principal factor de virulencia en muchas infecciones crónicas localizadas [21]–[23] es la formación de biofilms. Los biofilms, son comunidades de bacterias adheridas a una superficie y que se encuentran inmersas en material polimérico extracelular (EPS) (ver sección 1.3.1). Esta matriz polimérica constituye su principal barrera de defensa contra compuestos antimicrobianos, ya que genera la disminución de la concentración local de los agentes agresivos, resultando en una alta resistencia a los tratamientos comúnmente utilizados [24]–[26].

Estas infecciones frecuentemente suelen reaparecer luego de periodos prolongados de latencia clínica. Aunque el aumento de densidad de microorganismos en el biofilm pueden favorecer la mutación genética, este no es el principal motivo por el cual las infecciones reinciden, sino que, habiendo adoptado la forma de biofilm, las bacterias adquieren tolerancia a los antibióticos convencionales a través de la disminución del metabolismo o mecanismos de persistencia [27]. Incluso, se han encontrado casos en los que bajas concentraciones de antibióticos suelen producir la formación de biofilms mas robustos, como respuesta del microorganismo al estrés provocado por el medio [28], [29]. Esto conduce a un aumento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antibiótico cuando se requiere eliminar un biofilm ya formado. La CIM de un antibiótico se define como la menor concentración a partir de la cual es inhibido el crecimiento visible de un microorganismo. Si esta concentración es mayor a las que se alcanzan dentro del organismo, la bacteria es considerada resistente al antimicrobiano en cuestión [30].

Por otro lado, la resistencia a los antimicrobianos y las infecciones tardías también pueden asociarse a un fenotipo de bacterias llamadas persistentes o

persistidoras. Estas pertenecen a una subpoblación que representa el 1% de las bacterias totales en la comunidad, se encuentran metabólicamente inactivas y son fenotípicamente diferentes a las demás, permaneciendo indiferentes al efecto de un agente antimicrobiano [31]. Luego de que el tratamiento concluye, estas bacterias reanudan su crecimiento y se reproducen normalmente [32]. La presencia de estas bacterias persistentes se considera como un mecanismo de supervivencia de la comunidad bacteriana, aunque no está bien claro cómo surgen y son muchas las variables que favorecen el cambio de fenotipo [33]. En este sentido, en la bibliografía se reportan diversos factores desencadenantes, en su mayoría estudiados en bacterias planctónicas, como por ejemplo la restricción de nutrientes del medio, el estrés oxidativo, mecanismos SOS de reparación del ADN dañado, o la expresión aleatoria de ciertos genes [33]. En los biofilms, favorece la escasez de nutrientes en algunas zonas y la activación del sistema SOS [32].

Cerca del 20% de las muertes mundiales se deben a enfermedades infecciosas y aproximadamente el 80% de las infecciones en humanos son generadas por la formación de biofilms [34], [35], por lo que su desarrollo se ha estudiado ampliamente en diferentes superficies y con diferentes microorganismos, con el fin de contribuir al perfeccionamiento de estrategias diversas para su erradicación o prevención.

### **1.3.1 El Biofilm: descripción y desarrollo**

Los microorganismos pueden presentarse en dos fenotipos diferentes: el denominado estado planctónico o libre, y el estado sésil (adheridos a una superficie). Cuando las bacterias sésiles forman una colonia, se establece un biofilm [36]. Un biofilm se define como una comunidad bacteriana caracterizada por células que se hallan unidas a un sustrato o superficie, y que se encuentran rodeadas por una matriz extracelular que ellas mismas secretan. Las bacterias en los biofilms muestran un fenotipo alterado respecto del estado planctónico en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes, que determinan variaciones fisiológicas como por ejemplo, distinta producción de polisacáridos o proteínas, cambios en mecanismos de movilidad, o aletargamiento del metabolismo [32].

Se han encontrado biofilms en restos fósiles de miles de años, por lo que se lo considera como una parte fundamental en el ciclo vital de los organismos vivos y su supervivencia en el tiempo. Su desarrollo puede darse tanto en superficies bióticas como abióticas, y no siempre tiene connotaciones negativas: por ejemplo, en algunas raíces

de plantas producen efectos benéficos para el vegetal asistiendo en la fijación de nutrientes [24].

Esta forma de vida bacteriana les permite protegerse de ambientes nocivos y de ataques externos, por ejemplo con antibióticos, y, por otro lado, es una estrategia de colonización de nuevos nichos y redispersión. En el biofilm, las bacterias se comunican mediante pequeñas moléculas que constituyen un sistema llamado *quorum sensing* que depende de la densidad poblacional, mediante el cual se regulan muchas actividades, como por ejemplo el cambio de fenotipo, la síntesis y secreción de factores de virulencia o la maduración del biofilm [37].

El desarrollo de un biofilm consta de varias etapas (Figura 1.2), las cuales son:

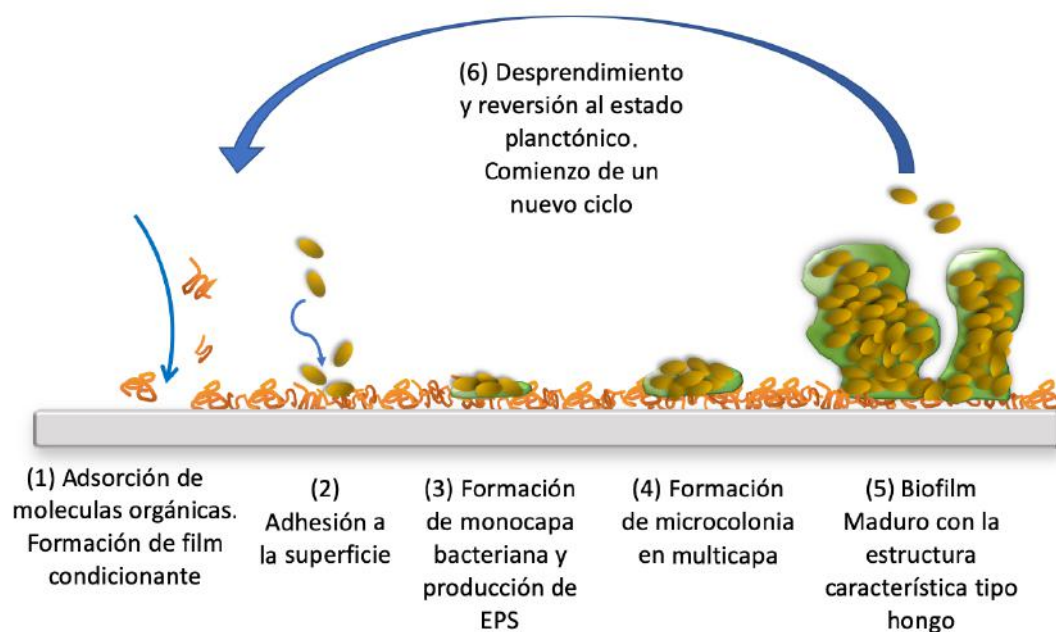


Figura 1.2: Esquema representativo de las etapas de formación del biofilm.

1) Acondicionamiento del sustrato: Inicialmente, se forma sobre la superficie del sustrato una capa de glicoproteínas y lípidos del ambiente que favorece la adhesión de las bacterias planctónicas ya que pueden servirles como fuente concentrada de alimento [38], [39]. Las características de esta capa dependerán de la composición de la

superficie y de las propiedades químicas y físicas del medio circundante, que determinan el tipo y la cantidad de moléculas adheridas.

2) Adhesión inicial: las células planctónicas que perciben la superficie condicionada pueden adherirse de dos maneras: activa y/o pasiva. En la adhesión activa están involucradas aquellas bacterias móviles gracias a los flagelos, fimbrias o pilis, que favorecen su desplazamiento hacia la superficie y la posterior adhesión. En el caso de aquellas que no poseen apéndices para la motilidad, el contacto se realiza a través de proteínas denominadas adhesinas que favorecen la adhesión a la superficie. En este caso también influyen factores externos como la difusión en el medio líquido en el que se encuentran, la gravedad, o precipitación de las células, que favorecen la adhesión de las primeras bacterias planctónicas.

3) Crecimiento: Las bacterias adheridas a la superficie (bacterias sésiles) comienzan a crecer y multiplicarse en el sitio de unión de las primeras células colonizadoras, formando una microcolonia en forma de monocapa. Las células adheridas y sus hijas producen y secretan al medio EPS que luego constituirá la matriz del biofilm. La composición del EPS difiere según la especie bacteriana. Por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* el principal componente es alginato [40] y para *Staphylococcus aureus* es poli-N-acetil-glucosamina [22]. La matriz del biofilm crece y adquiere una estructura 2D.

4) Formación de microcolonias en multicapa: las colonias comienzan a crecer y expandirse, formando capas unas sobre otras, embebidas en el EPS secretado. Estos procesos son regulados por el mecanismo de *quorum sensing*.

5) Maduración: En esta etapa se desarrolla la maduración del biofilm, generando estructuras muy complejas que poseen canales, poros y una nueva distribución de las bacterias que lo componen. El biofilm adquiere estructuras 3D con formas muy singulares, similares a hongos sobre la superficie del sustrato.

6) Dispersión: Cuando el biofilm ha alcanzado la madurez, algunas bacterias aisladas o colonias ubicadas en la parte exterior se liberan de la matriz para poder colonizar otra zona del sustrato o nuevas superficies, finalizando el proceso del desarrollo del biofilm. Este proceso se encuentra altamente regulado, y puede iniciarse por señales intra o intercelulares, en respuesta a cambios en el medio, como fluctuaciones del pH o del nivel nutricional, o bien fuerzas externas como una disminución del flujo (en una tubería o catéter, por ejemplo), o abrasiones a la superficie.

Un estudio en *Pseudomonas aeruginosa* sugiere que la dispersión ocurre en tanto condiciones de crecimiento favorables o no, ya que contribuye a la supervivencia de la comunidad bacteriana y a la expansión de la misma hacia otras superficies [32].

Los biofilms maduros forman una estructura tridimensional con numerosos microambientes que difieren en su osmolaridad, acceso a los nutrientes del medio, y densidad de células. Esta heterogeneidad de fenotipos contribuye también a la resistencia antimicrobiana y formación de persistentes [41]. Adicionalmente, la matriz del biofilm proporciona resistencia mecánica al formar una barrera que impide la penetración de ciertos antibióticos. En otros casos, la presencia de moléculas negativas como el alginato, disminuyen la difusión de antimicrobianos de carga positiva y le otorgan resistencia frente al sistema inmune del hospedador, como la fagocitosis o la acción de proteínas antimicrobianas [40].

Las bacterias comúnmente encontradas en dispositivos implantables infectados son *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [42] y *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) en el caso de implantes dentales [43].

#### **1.4 Nuevas estrategias para erradicar biofilms.**

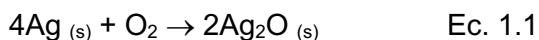
##### **1.4.1 Nanopartículas de plata**

Entre las nanopartículas metálicas con conocida actividad antimicrobiana, las nanopartículas de plata (AgNPs) son particularmente efectivas como agentes antimicrobianos [44]. En los últimos años, las aplicaciones biomédicas de las AgNPs han aumentado considerablemente, siendo utilizadas con éxito en el campo de la nanoingeniería médica y farmacéutica para el *delivery* de agentes terapéuticos, en el diagnóstico de enfermedades crónicas [45], en el diseño de nano sensores [46], [47], tratamiento contra el cáncer [48], fabricación de pinturas [49], en la industria textil [50], entre otras, debido a sus propiedades físicas, ópticas y biológicas. Estas propiedades se asocian estrechamente a la forma, tamaño y composición de las mismas, permitiendo adaptar la síntesis de AgNPs al objetivo requerido.

Existen actualmente claras evidencias de que el efecto antimicrobiano de las AgNPs depende del tamaño y la forma de las mismas [51]–[53]. En relación al tamaño, las AgNPs de menor tamaño suelen tener mayor toxicidad, ya que aumenta el área específica y activa de las nanopartículas, permitiendo mayor interacción de estas con el

entorno. Además, las nanopartículas con formas triangulares presentan mayor actividad antibacteriana que las barras o esferas [52].

En cuanto al mecanismo de acción antimicrobiana de las AgNPs, se han propuesto en la literatura diferentes tipos (algunos de los cuales se representan en la figura 1.3): i) Adhesión de las AgNPs a la membrana bacteriana, modificando la bicapa lipídica y/o alterando la permeabilidad de la misma; ii) Penetración intracelular de las AgNPs [54], ocasionando la interacción de estas con proteínas de la membrana bacteriana, proteínas intracelulares, residuos fosfatos del ADN, y también la interrupción del mecanismo de división celular, produciendo así la muerte del microorganismo [55]; iii) Modulación de vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis; iv) La liberación de iones  $\text{Ag}^+$  [56]–[58], considerado como el principal mecanismo antimicrobiano. Las AgNPs se encuentran parcialmente oxidadas en un medio acuoso en presencia de oxígeno, y, bajo ciertas condiciones, se produce la liberación sostenida de los iones al medio [59]. El mecanismo propuesto para la disolución de las AgNPs se basa en la disolución oxidativa, según las siguientes reacciones:



El proceso se inicia con la oxidación de la plata metálica en la superficie de las AgNPs por el  $\text{O}_2$  disuelto. Esto conlleva la formación de una capa de óxido de plata de 1-2 nm que, a su vez, se disuelve liberando iones  $\text{Ag}^+$  al medio hasta que se agota el óxido [60], [61]. Cuando esto sucede, una nueva oxidación de la plata metálica tiene lugar, y continúa el ciclo de disolución. Cuando las AgNPs se encuentran en solución acuosa a pH neutro, el  $\text{Ag}_2\text{O}$  superficial se cubre de grupos OH ( $\text{Ag}-\text{OH}$ ), los cuales se protonan a pH ácido ( $\text{Ag}-\text{OH}_2^+$ ) [62]. Este estado protonado tiende a debilitar y romper los enlaces  $\text{Ag}-\text{O}$  superficiales, favoreciendo un incremento en la cantidad de  $\text{Ag}^+$  que se libera [63]. Lok y colaboradores han calculado que aproximadamente un 12% de la plata de las AgNPs está presente en forma de iones, estrechamente ligada a la capa de óxido superficial [64]. Adicionalmente, otros estudios han reportado que los iones  $\text{Ag}^+$  producen daño por estrés oxidativo a partir de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

[65], [66], como por ejemplo radicales libres, que dañan organelas intracelulares y biomoléculas importantes como ADN, lípidos y proteínas [67], [68].

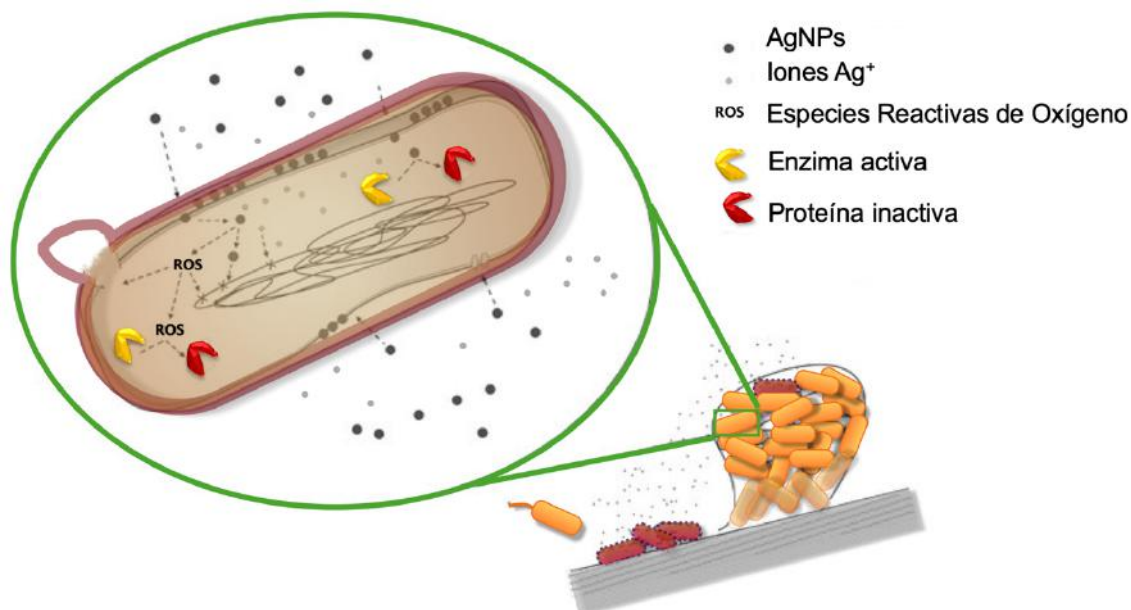


Figura 1.3: Esquema representativo de algunos mecanismos de acción antimicrobiana de las AgNPs.

La capacidad microbicida de las AgNPs se ha comprobado en una amplia variedad de microorganismos, tanto en estado planctónico como formando biofilms, como por ejemplo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Serratia proteamaculans*, *S. epidermidis* y *Mycobacterium spp*, entre otros [69]–[71]. Asimismo, se ha estudiado el efecto de la acción combinada de AgNPs y antibióticos, encontrándose efectos sinérgicos que permiten disminuir las dosis de estos últimos, y por lo tanto, el riesgo de desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos [72], [73]. Particularmente, una de las características que hace más interesante la utilización de las AgNPs, es que no hay evidencias del desarrollo de resistencia bacteriana a la plata [54]. Por esta razón, se ha propuesto implementar las AgNPs sobre distintos dispositivos de uso médico. Una de las estrategias más abordadas es la modificación de las superficies de los materiales para prevenir la formación del biofilm bacteriano, interviniendo en la etapa 2 de su formación, y, en los últimos años, se ha focalizado en el desarrollo de superficies multicomponentes, que combinen más de un agente para producir diferentes efectos en



simultáneo [74]. Esta estrategia ya ha empezado a implementarse sobre catéteres [75], vendas [76], textiles [77] y superficies biomédicas como titanio o polímeros [78], [79]

Por otra parte, el amplio uso que están teniendo las AgNPs ha despertado el interés por estudiar si los mismos mecanismos que resultan útiles para eliminar bacterias u otros microorganismos afectaría también a las células y tejidos eucariotas. Algunos reportes indican una citotoxicidad dosis-dependiente en tratamientos con AgNPs de 7 nm inyectadas por vía intravenosa en una única dosis, con ciertos niveles de genotoxicidad en el hígado. Sin embargo, no hay un consenso respecto a la toxicidad en mamíferos ya que no hay suficientes estudios genómicos-moleculares al respecto [80]. También se ha observado que las AgNPs de tamaños mayores no provocan daños acumulativos en tejidos de mamíferos, mientras que aquellas mas pequeñas si lo hacen [81]. Por otro lado, estudios sobre la irritabilidad dérmica y toxicidad oral en ratas indican que no hay signos clínicos de genotoxicidad o mortalidad a dosis de 2000 mg/kg, y que tampoco hay signos de corrosión o irritación dérmica en ojos ni en piel en la mayoría de los animales testeados, clasificando a las AgNPs como agente sensibilizante leve de la piel [82]. Algunos autores han estudiado posibles mecanismos de citotoxicidad de las AgNPs en los que se encontró una relación entre el tamaño de las nanopartículas y la viabilidad celular y diferenciación en osteoblastos y osteoclastos al cultivarse estas células con nanopartículas en dispersión [83], [84]. Sin embargo, sigue siendo poco claro si este efecto está relacionado con las partículas en sí o por los iones  $\text{Ag}^+$  producidos durante la disolución de las mismas. En este sentido, hay evidencias del impacto de ambos factores; algunos autores reportaron que las AgNPs son internalizadas por células, produciendo daño mediante estrés oxidativo [85] y otros, que los iones  $\text{Ag}^+$  provocan apoptosis, daños en el ADN y regresión del ciclo celular [86], [87].

La gran mayoría de estos estudios resaltan la dependencia de la citotoxicidad con la concentración de AgNPs y de iones  $\text{Ag}^+$ . Sin embargo, también se han reportado estudios que indican que la incorporación de AgNPs a una superficie de titanio mejora la proliferación de células osteoblásticas [88]. Es evidente, entonces, que se necesitan más ensayos, incluyendo investigaciones *in vivo*, para resolver esta discrepancia. En cuanto al recubrimiento de materiales implantables con AgNPs, se han informado varios estudios clínicos utilizando implantes de titanio recubiertos con plata que no presentaron evidencias de citotoxicidad, ya que la plata liberada no alcanza concentraciones lo suficientemente elevadas para provocar efectos adversos [83], [89], [90]. Además, las

concentraciones de AgNPs que se depositan sobre las superficies son muy bajas comparadas con las utilizadas en los ensayos *in vivo* disponibles en la bibliografía.

#### **1.4.2 Funcionalización de superficies con aplicaciones en biomedicina.**

En los últimos años, la investigación científica a nivel mundial, y específicamente en nuestro país se ha ido orientando a la resolución de problemas de interés social. En este contexto, ha habido grandes avances en el campo de la fabricación de estructuras en la nanoescala aplicadas a la salud, y los más recientes desarrollos permiten abordar una amplia variedad de problemas en esta área, como mejoras en diagnósticos, prevención y tratamiento de enfermedades, regeneración de tejidos, etc., con el objetivo de desarrollar mejores tratamientos, apuntando particularmente a mejorar la calidad de vida de las personas.

La Nanomedicina, considerada la medicina del futuro [91], apunta a aplicar las herramientas y principios derivados de la nanotecnología a la medicina y la ingeniería biomédica para el desarrollo de nuevos dispositivos y el mejoramiento de dispositivos ya existentes[92]. Entre las estrategias derivadas de nanotecnología, la funcionalización de superficies se ha transformado en un instrumento de suma importancia para el desarrollo y diseño de nuevos materiales [93] debido a que las propiedades superficiales rigen el comportamiento y el desempeño general del material, por lo que su modificación superficial proporciona la posibilidad de controlar las interacciones y respuestas de la superficie requeridas para una aplicación en particular. De esta manera, es posible adaptar la superficie del material para cumplir un objetivo determinado, incorporando funcionalidades específicas, que permiten superar las carencias del material en cuanto a su interacción con el medio, pero manteniendo las propiedades del material masivo. Como ejemplos, pueden encontrarse la producción de sensores para diagnóstico y terapia de tamaños muy pequeños y con alta sensibilidad [94], [95], o el mejoramiento de las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de los biomateriales [96]–[98].

En los últimos años se han desarrollado y optimizado diversas estrategias para la modificación de superficies en la nano/microescala, entre las que se incluyen, por un lado, el ajuste de la rugosidad y/o topografía (modificación física), que actúan como condicionantes de la adhesión de células eucariotas y bacterianas [11], [12], [99]–[101]; la adecuación de la carga superficial, propiedades de mojado y/o reactividad (modificación química a través de compuestos orgánicos o inorgánicos); y la adaptación de la biocompatibilidad y/o bioreactividad (modificación biológica a través de

biomoléculas). Desde el punto de vista de la química superficial, se pueden diseñar recubrimientos con objetivos específicos, como por ejemplo moléculas biológicamente activas que estimulen el crecimiento y diferenciación de células para promover un proceso regenerativo del tejido [102], moléculas que permitan la distribución y liberación controlada de fármacos [103], nanopartículas [104] y ciertos antibióticos [105] que inhiban la formación de biofilms.

#### **1.4.2.1 Superficies antimicrobianas**

Una implantación exitosa y la supervivencia del implante determinan la facilidad con la que el implante se integrará en el entorno biológico del cuerpo del paciente y su habilidad para prevenir el crecimiento bacteriano. Con este fin, hay varios parámetros a considerarse: i) la superficie y las propiedades del material del implante, ii) el tipo de patógeno, y iii) la calidad del sistema inmune del paciente, que en general está deteriorada en las proximidades del material sintético, desfavoreciendo la fagocitosis de las células bacterianas. Estas interacciones son factores críticos a la hora de elegir la superficie apropiada para los dispositivos médicos según el tratamiento requerido. La competencia entre bacterias y células del huésped por la colonización de la superficie es un factor crucial, y el riesgo de Infección disminuye drásticamente si el implante es colonizado completamente por células del paciente, ya que no deja superficie libre para la adhesión y proliferación de microorganismos [106].

Algunas de las características necesarias para lograr una superficie eficiente incluyen, por ejemplo (figura 1.4), que tenga propiedades y funciones específicas, que pueda adaptarse según los requerimientos del paciente y el caso a tratar, que pueda producirse en serie y resista los métodos de esterilización, que sea biocompatible, que tenga estabilidad mecánica y que conserve sus propiedades antimicrobianas durante el tiempo adecuado.

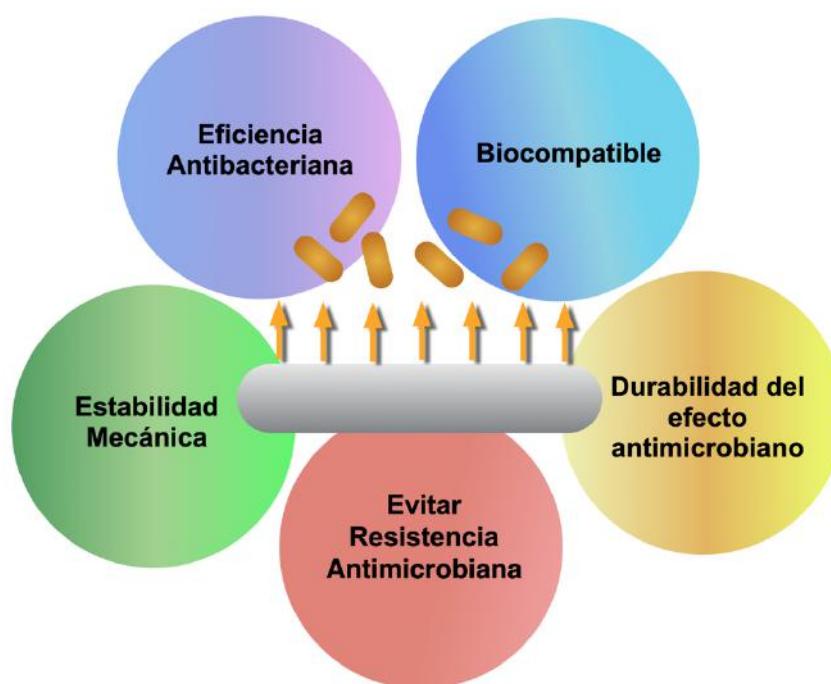


Figura 1.4: Requerimientos de una superficie antimicrobiana.

Con el propósito de eliminar o reducir significativamente la adhesión bacteriana y la formación de biofilms de estas superficies, las investigaciones se han enfocado en la fabricación de nuevas superficies o en el mejoramiento de las ya existentes, por ejemplo, mediante el recubrimiento con compuestos antimicrobianos, o la modificación de la topografía [107], [108]. Esta estrategia resulta sumamente atractiva ya que al evitar la adhesión bacteriana durante las primeras etapas de formación del biofilm se imposibilita el desarrollo de una película madura que, como se mencionó anteriormente, es extremadamente difícil de erradicar. Además, al liberarse desde la superficie el agente microbiano, se evitaría uno de los factores de resistencia del biofilm que es la difusión de moléculas desde el exterior. Las estrategias de modificación superficial pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Modificaciones físicas, donde se perfecciona la topografía, por ejemplo a través de la implementación de patrones nanométricos que atrapan las bacterias y las matan, o bien, que modifican la rugosidad y las propiedades de mojado superficial, previniendo el contacto con los microorganismos [109], [110].

- Modificaciones químicas, donde se recubre la superficie con moléculas antimicrobianas (como péptidos o polímeros) o que prevengan la adhesión [111], [112], o bien, el anclaje de compuestos activos que liberan agentes antimicrobianos al medio (por ejemplo, titanio recubierto con AgNPs) [113]. Dentro de este grupo se destacan las denominadas superficies inteligentes, que pueden liberar el agente antibacteriano luego de recibir un determinado estímulo, como puede ser cambio de pH, exposición a la luz [114]–[116], etc.

Entre las superficies químicamente modificadas resulta particularmente interesante el desarrollo de recubrimientos con AgNPs, debido a las propiedades antimicrobianas que se mencionaron anteriormente. Se ha estudiado en gran medida distintas estrategias de funcionalización de distintos materiales, incluyendo el Ti, con AgNPs, y la mayoría de ellas requieren métodos que involucran varias etapas y moléculas mediadoras de la adsorción. Una alternativa rápida, simple y económica para la modificación de Ti ha sido desarrollada previamente en el grupo de la Dra. Schilardi, que consiste en la adsorción directa de AgNPs sobre titanio, aprovechando la capa de óxido superficial del mismo y su interacción con el recubrimiento de las nanopartículas [113], [117]. Estas superficies son estables y con buenas propiedades antimicrobianas y establecen un antecedente clave en el diseño de nuevas estrategias de modificación superficial.

## **1.5 Superficies Multicomponentes**

Las últimas investigaciones sobre modificación superficial para combatir biofilms se centran en la necesidad de utilizar estrategias integrales que actúen sobre las diferentes fases del proceso de formación del biofilm, e incluso añadir propiedades extra. Es decir, con una única superficie, combinar diferentes mecanismos de ataque antimicrobiano [118]. Por ejemplo, se han desarrollado superficies de titanio que combinan AgNPs y antibióticos, produciendo un efecto antimicrobiano en dos etapas: primero actúa el compuesto antimicrobiano y luego permanece la acción prolongada de los iones liberados por las AgNPs [119]. Otros autores recurren al uso de péptidos implicados en el crecimiento o adhesión de células eucariotas (como el conocido RGD) junto con péptidos antimicrobianos, obteniendo superficies antibacterianas que a la vez acrecientan la biocompatibilidad del material [120], [121].

### **1.5.1 Inmovilización de Biomoléculas**

Una forma de obtener superficies multicomponentes es a través del empleo de moléculas bioactivas o biomoléculas, ya sea combinando diferentes biomoléculas entre

sí, o bien con otro tipo compuestos (como antibióticos o AgNPs, por ejemplo). Estas biomoléculas pueden ser anticuerpos, enzimas, péptidos o proteínas, polisacáridos y/o ácidos nucleicos [122], con funciones específicas de acuerdo al objetivo buscado. Particularmente, los últimos avances en biomedicina se centran en la inmovilización de biopolímeros (proteínas) en la superficie del titanio, con el propósito de reducir la exposición del material extraño en el cuerpo y otorgarle propiedades favorables, como pueden ser propiedades antimicrobianas o anticoagulantes, entre otras. Esto puede lograrse debido a que estas moléculas se encuentran normalmente en los tejidos que debe sustituir el dispositivo, por lo que actúan como mediadoras de la adhesión celular y como factor estimulante del crecimiento y proliferación de células del tejido propio [123]. Además, debido al origen biológico de estas moléculas, no son reconocidas como agentes extraños, y se evita de esta forma la activación del sistema inmune, que suele ocasionar rechazos de prótesis o implantes.

El desafío principal que se presenta al trabajar con biomoléculas reside en la necesidad de conservar su bioactividad, evitando cambios conformacionales que puedan derivar en la inactivación tanto de las proteínas del recubrimiento o de aquellas presentes en el medio circundante. Por lo tanto, se requiere especial cuidado en la elección de moléculas que sean estables, solubles en fluidos biológicos y sencillas de manipular.

Para inmovilizar biomoléculas en superficies metálicas se utilizan diversas técnicas como por ejemplo electroquímica [124], fotoquímica, silanización [125], y modificación a través de monocapas autoensambladas [126]. Estas últimas suelen utilizar monocapas de compuestos con tioles o siloxanos que otorgan a la superficie una estructura bien definida y fácil de manipular.

## **1.6 Objetivos del trabajo de tesis**

En base a los lineamientos antes descriptos, en este trabajo de Tesis se plantea como objetivo general diseñar estrategias de multi-funcionalización de titanio y de AgNPs con moléculas biológicamente activas (proteínas, péptidos, etc.) y nanopartículas, así como la caracterización fisicoquímica acabada de estos sistemas, para generar interfases material/fluido biológico capaces de regular y optimizar la interacción del material con células eucariotas y prevenir la formación de biofilms. Para lograr dicho objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos a desarrollar:

1) *Funcionalizar superficies de titanio con biomoléculas que le confieran a éste propiedades específicas, (antimicrobianas, promotores de adhesión celular, reguladores de interacciones material/fluido biológico, etc.) de manera de optimizar la interacción con el entorno biológico.*

2) *Funcionalizar nanopartículas de plata (AgNPs) con biomoléculas con propiedades antimicrobianas para evaluar el efecto combinado de ambos agentes antimicrobianos.*

3) *Caracterizar los materiales antes y después de su modificación evaluando sus propiedades fisicoquímicas superficiales (hidrofilicidad, composición química, topografía, etc).*

4) *Estudiar la performance de los sistemas preparados en los entornos biológicos para los que fueron diseñados.*

Para alcanzar los objetivos se estudiaron los siguientes sistemas:

- Titanio modificado con AgNPs de forma directa o a través de Poli-L-Lisina (un polímero de aminoácidos Lisina)
- Titanio modificado con Lactoferrina Bovina (una proteína láctea)
- Titanio modificado con AgNPs y Lactoferrina Bovina
- AgNPs funcionalizadas con esta misma proteína.

## 1.6 Bibliografía

- [1] FDA, 'Implants and Prosthetics | FDA', 2019. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/medical-devices/products-and-medical-procedures/implants-and-prosthetics>.
- [2] J. A. Bishop, A. A. Palanca, M. J. Bellino, and D. W. Lowenberg, 'Assessment of compromised fracture healing', *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 20, no. 5. pp. 273–282, May-2012.
- [3] Ministerio de Salud Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Instituto Nacional de Epidemiología (INE) Sociedad Argentina de Infectología (SADI)., 'Documento Final de Consenso Interinstitucional "Actualización Sobre Medidas de Prevención de Infecciones de Sitio Quirúrgico"', 2015.
- [4] A. J. Tande and R. Patel, 'Prosthetic joint infection', *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 302–345, Apr. 2014.
- [5] C. Pensotti *et al.*, 'RECOMENDACIONES PARA LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES ASOCIADAS A ARTOPLASTIA ELECTIVA EN ADULTOS.', *Medicina (B. Aires)*, vol. 77, no. 2, pp. 143–157, 2017.
- [6] J. S. VanEpps and J. G. Younger, 'Implantable Device-Related Infection', *SHOCK*, vol. 46, no. 6, pp. 597–608, Dec. 2016.
- [7] World Health Organization; Pan American Health Organization, 'Decontamination and Reprocessing of Medical Devices for Health-care Facilities'. World Health Organization, Pan American Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 1–120, 2016.
- [8] J. N. Ducel, G; Fabry, 'Prevention of Hospital-Acquired Infections : A Practical Guide', in *World Health Organization*, 2nd ed., L. Ducel, G; Fabry, J; Nicolle, Ed. Geneva, Switzerland, 2002, pp. 1–72.
- [9] J. O' Neil, 'Review on Antibiotic resistance. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations', 2014.
- [10] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, 'Biomaterials Science', in *Biomaterials Science*, 2nd ed., Elsevier, 1996, pp. 1–879.
- [11] X. Yao, R. Peng, and J. Ding, 'Cell-Material Interactions Revealed Via Material Techniques of Surface Patterning', *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 37, pp. 5257–5286, Oct. 2013.
- [12] R. R. Resende *et al.*, 'Scale/Topography of Substrates Surface Resembling Extracellular Matrix for Tissue Engineering', *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1157–1193, Jul. 2014.
- [13] K. Nair, C. V. Muraleedharan, and G. S. Bhuvaneshwar, 'Developments in mechanical heart valve prosthesis', *Sadhana - Acad. Proc. Eng. Sci.*, vol. 28, no. 3–4, pp. 575–587, 2003.
- [14] R. Chang, *Química*, vol. 53. 2013.
- [15] M. Niinomi, Y. Liu, M. Nakai, H. Liu, and H. Li, 'Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone', *Regenerative Biomaterials*, vol. 3, no. 3. Oxford University Press, pp. 173–185, 01-Jun-2016.
- [16] T. Akahori, M. Niinomi, H. Fukui, M. Ogawa, and H. Toda, 'Improvement in fatigue



- characteristics of newly developed beta type titanium alloy for biomedical applications by thermo-mechanical treatments', in *Materials Science and Engineering C*, 2005, vol. 25, no. 3, pp. 248–254.
- [17] Y. Tanaka, H. Saito, Y. Tsutsumi, H. Doi, H. Imai, and T. Hanawa, 'Active hydroxyl groups on surface oxide film of titanium, 316L stainless steel, and cobalt-chromium-molybdenum alloy and its effect on the immobilization of polyethylene glycol', *Mater. Trans.*, vol. 49, no. 4, pp. 805–811, 2008.
  - [18] Y. T. Sul, 'The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant', *Biomaterials*, vol. 24, no. 22, pp. 3893–3907, Oct. 2003.
  - [19] E. McCafferty and J. P. Wightman, 'X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium', *Appl. Surf. Sci.*, vol. 143, no. 1, pp. 92–100, Apr. 1999.
  - [20] D. J. Gorth, S. Puckett, B. Ercan, T. J. Webster, M. Rahaman, and B. Sonny Bal, 'Decreased bacteria activity on Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> surfaces compared with PEEK or titanium', *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4829–4840, 2012.
  - [21] J. M. Yarwood, K. M. Paquette, I. B. Tikh, E. M. Volper, and E. P. Greenberg, 'Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms.', *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 22, pp. 7961–7, Nov. 2007.
  - [22] P. L. Phillips and G. S. Schultz, 'Molecular Mechanisms of Biofilm Infection: Biofilm Virulence Factors', *Adv. Wound Care*, vol. 1, no. 3, pp. 109–114, Jun. 2012.
  - [23] J. W. Costerton, L. Montanaro, and C. R. Arciola, 'Biofilm in implant infections: its production and regulation.', *Int. J. Artif. Organs*, vol. 28, no. 11, pp. 1062–8, Nov. 2005.
  - [24] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, 'Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, Feb-2004.
  - [25] T. F. Mah and G. A. O'Toole, 'Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.', *Trends Microbiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 34–9, Jan. 2001.
  - [26] P. S. Stewart and J. W. Costerton, 'Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.', *Lancet (London, England)*, vol. 358, no. 9276, pp. 135–8, Jul. 2001.
  - [27] H. C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, and S. Kjelleberg, 'Biofilms: An emergent form of bacterial life', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, no. 9, pp. 563–575, 11-Sep-2016.
  - [28] L. Qi *et al.*, 'Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*', *Front. Microbiol.*, vol. 7, Apr. 2016.
  - [29] J. B. Kaplan, 'Antibiotic-induced biofilm formation', *International Journal of Artificial Organs*, vol. 34, no. 9, pp. 737–751, Sep-2011.
  - [30] Servicio Antimicrobianos - INEI – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", 'Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución', in *MIC Testing*, 2012, vol. 32, no. 2, pp. 1–48.
  - [31] K. Lewis, 'Persister cells, dormancy and infectious disease', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, no. 1, pp. 48–56, Jan-2007.

- [32] N. Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler, 'Bacterial persistence as a phenotypic switch', *Science* (80-. ), vol. 305, no. 5690, pp. 1622–1625, Sep. 2004.
- [33] D. Lebeaux, J.-M. Ghigo, and C. Beloin, 'Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 78, no. 3, pp. 510–543, 2014.
- [34] D. Davies, 'Understanding biofilm resistance to antibacterial agents', *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 2, pp. 114–122, Feb. 2003.
- [35] M. Jamal *et al.*, 'Bacterial biofilm and associated infections', *J. Chinese Med. Assoc.*, vol. 81, no. 1, pp. 7–11, Jan. 2018.
- [36] Z. Khatoon, C. D. McTiernan, E. J. Suuronen, T.-F. Mah, and E. I. Alarcon, 'Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention.', *Heliyon*, vol. 4, no. 12, p. e01067, Dec. 2018.
- [37] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, 'Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.', *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, Feb. 2004.
- [38] M. R. Parsek and E. P. Greenberg, 'Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms', *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–33, Jan. 2005.
- [39] N. Siboni, M. Lidor, E. Kramarsky-Winter, and A. Kushmaro, 'Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment', *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 274, no. 1, pp. 24–29, Sep. 2007.
- [40] D. P. Bakker, J. W. Klijnstra, H. J. Busscher, and H. C. Van Der Mei, 'The Effect of Dissolved Organic Carbon on Bacterial Adhesion to Conditioning Films Adsorbed on Glass from Natural Seawater Collected during Different Seasons', *Biofouling*, vol. 19, no. 6, pp. 391–397, Dec. 2003.
- [41] M. Shirliff, D. J. Hassett, and M. R. Parsek, 'The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN-Mediated Macrophage Killing', *Artic. J. Immunol.*, 2006.
- [42] P. S. Stewart and M. J. Franklin, 'Physiological heterogeneity in biofilms', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 3, pp. 199–210, Mar-2008.
- [43] T. F. Moriarty *et al.*, 'Orthopaedic device-related infection: Current and future interventions for improved prevention and treatment', *EFORT Open Rev.*, vol. 1, no. 4, pp. 89–99, Apr. 2016.
- [44] M. Godoy-Gallardo *et al.*, 'Antibacterial Coatings on Titanium Surfaces: A Comparison Study between in Vitro Single-Species and Multispecies Biofilm', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 10, pp. 5992–6001, 2015.
- [45] T. J. Webster and I. Seil, 'Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature', *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 2767, Jun. 2012.
- [46] C. Li *et al.*, 'In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag2S quantum dots in the NIR-II window', *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, pp. 393–400, 2014.
- [47] W. Liu, T. Guo, A. C. Wong, H.-Y. Tam, and S. He, 'Highly sensitive bending sensor based on Er<sup>3+</sup>-doped DBR fiber laser', *Opt. Express*, vol. 18, no. 17, p. 17834, Aug. 2010.

- [48] T. Thiawong, K. Onlaor, and B. Tunhoo, 'A Humidity Sensor Based on Silver Nanoparticles Thin Film Prepared by Electrostatic Spray Deposition Process', *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2013, pp. 1–7, Jun. 2013.
- [49] S. Gurunathan, J. H. Park, J. W. Han, and J. H. Kim, 'Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Targeting p53 for anticancer therapy', *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 4203–4223, 2015.
- [50] N. Bellotti, R. Romagnoli, C. Quintero, C. Domínguez-Wong, F. Ruiz, and C. Deyá, 'Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints', *Prog. Org. Coatings*, vol. 86, pp. 33–40, Sep. 2015.
- [51] D. Ballottin *et al.*, 'Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*', *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 582–589, Jun. 2017.
- [52] A. Panáček *et al.*, 'Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity', *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 33, pp. 16248–16253, Aug. 2006.
- [53] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, 'Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*.', *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1712–20, Mar. 2007.
- [54] J. R. Morones *et al.*, 'The bactericidal effect of silver nanoparticles', *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, Oct. 2005.
- [55] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, 'Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 275, no. 1, pp. 177–182, Jul. 2004.
- [56] C. M. Santoro, N. L. Duchsherer, and D. W. Grainger, 'Minimal in vitro antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles', *Nanobiotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 55–65, May 2007.
- [57] P. V Asharani, Y. Lian Wu, Z. Gong, and S. Valiyaveetil, 'Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models', *Nanotechnology*, vol. 19, no. 25, p. 255102, Jun. 2008.
- [58] C. Damm and H. Münstedt, 'Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites', *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 91, no. 3, pp. 479–486, Jun. 2008.
- [59] S. H. Lee and B. H. Jun, 'Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine', *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 4. MDPI AG, 02-Feb-2019.
- [60] A. Kuzma *et al.*, 'Influence of surface oxidation on plasmon resonance in monolayer of gold and silver nanoparticles', *J. Appl. Phys.*, vol. 112, no. 10, Nov. 2012.
- [61] C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry, and G. E. Brown, 'Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity', *Environmental Science and Technology*, vol. 46, no. 13. pp. 6900–6914, 03-Jul-2012.
- [62] J. J. Werner, Stumm; Morgan, *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, 3rd ed. Danvers, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

- [63] T. S. Peretyazhko, Q. Zhang, and V. L. Colvin, 'Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes', *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, no. 20, pp. 11954–11961, Oct. 2014.
- [64] C.-N. Lok *et al.*, 'Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities', *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 12, no. 4, pp. 527–534, Apr. 2007.
- [65] H.-J. Park *et al.*, 'Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity', *Water Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 1027–1032, Mar. 2009.
- [66] E. T. Hwang *et al.*, 'Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria', *Small*, vol. 4, no. 6, pp. 746–750, Jun. 2008.
- [67] H. Wolfmeier, D. Pletzer, S. C. Mansour, and R. E. W. Hancock, 'New Perspectives in Biofilm Eradication', *ACS Infectious Diseases*, vol. 4, no. 2, pp. 93–106, 2018.
- [68] I. S. Hwang, J. Lee, J. H. Hwang, K. J. Kim, and D. G. Lee, 'Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals', *FEBS J.*, vol. 279, no. 7, pp. 1327–1338, Apr. 2012.
- [69] M. A. Radzig, V. A. Nadtochenko, O. A. Koksharova, J. Kiwi, V. A. Lipasova, and I. A. Khmel, 'Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action', *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 102, pp. 300–306, Feb. 2013.
- [70] M. A. Ansari *et al.*, 'Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections', *Biol. Med.*, vol. 3, no. 2 SPECIALISSUE, pp. 141–146, 2011.
- [71] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, 'Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 275, no. 1, pp. 177–182, Jul. 2004.
- [72] K. G. and A. K. KRYSTYNA I. WOLSKA\*, 'Synergy Between Novel Antimicrobials and Conventional Antibiotics or Bacteriocins', *Polish J. Microbiol.*, vol. 61, no. 2, pp. 95–104, 2012.
- [73] A. R. Shahverdi, A. Fakhimi, H. R. Shahverdi, and S. Minaian, 'Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*', *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 168–171, Jun. 2007.
- [74] E. P. Ivanova and R. J. Crawford, *Antibacterial surfaces*. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [75] R. Mala *et al.*, 'Foley catheters functionalised with a synergistic combination of antibiotics and silver nanoparticles resist biofilm formation', *IET Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 5, pp. 612–620, Aug. 2017.
- [76] M. Rahimi, R. Ahmadi, H. Samadi Kafil, and V. Shafiei-Irannejad, 'A novel bioactive quaternized chitosan and its silver-containing nanocomposites as a potent antimicrobial wound dressing: Structural and biological properties', *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 101, pp. 360–369, Aug. 2019.
- [77] S. Manjula, O. L. Shanmugasundaram, B. M. Gnanamangai, R. Pavithra, S. Kavitha, and P. Ponmurugan, 'Plasma treated fabrics coated with naturally derived Ag-NPs for biomedical application', *IET Nanobiotechnology*, vol. 13, no.

- 4, pp. 368–375, Jun. 2019.
- [78] T. Kumeria *et al.*, 'Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties', *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 130, pp. 255–263, 2015.
  - [79] T. Li, N. Wang, S. Chen, R. Lu, H. Li, and Z. Zhang, 'Antibacterial activity and cytocompatibility of an implant coating consisting of TiO<sub>2</sub> nanotubes combined with a GL13K antimicrobial peptide', *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 12, pp. 2995–3007, Apr. 2017.
  - [80] Y. J. Kim *et al.*, 'Assessment of in vivo genotoxicity of citrated-coated silver nanoparticles via transcriptomic analysis of rabbit liver tissue.', *Int. J. Nanomedicine*, vol. 14, pp. 393–405, 2019.
  - [81] C. Recordati *et al.*, 'Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects', *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, p. 12, Feb. 2016.
  - [82] J. S. Kim *et al.*, 'Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles', *Nanotoxicology*, vol. 7, no. 5, pp. 953–960, Aug. 2013.
  - [83] G. Gosheger *et al.*, 'Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model: an analysis of the infection rate and toxicological side effects', *Biomaterials*, vol. 25, no. 24, pp. 5547–5556, Nov. 2004.
  - [84] S. Kim and D. Y. Ryu, 'Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues', *J. Appl. Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 78–89, Feb. 2013.
  - [85] C. Carlson *et al.*, 'Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species', *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 43, pp. 13608–13619, Oct. 2008.
  - [86] W. Liu *et al.*, 'Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size', *Nanotoxicology*, vol. 4, no. 3, pp. 319–330, Sep. 2010.
  - [87] F. Barras, L. Aussel, and B. Ezraty, 'Silver and antibiotic, new facts to an old story', *Antibiotics*, vol. 7, no. 3. MDPI AG, 01-Sep-2018.
  - [88] H. Cao, X. Liu, F. Meng, and P. K. Chu, 'Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects', *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 693–705, 2011.
  - [89] V. Alt, 'Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics—A clinical review and risk-benefit analysis', *Injury*, vol. 48, no. 3, pp. 599–607, Mar. 2017.
  - [90] J. HARDES *et al.*, 'Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans', *Biomaterials*, vol. 28, no. 18, pp. 2869–2875, Jun. 2007.
  - [91] S. Abeer, 'Future Medicine: Nanomedicine', *JIMSA*, vol. 25, no. 3, pp. 187–192, 2012.
  - [92] A. J. Thorley and T. D. Tetley, 'New perspectives in nanomedicine', *Pharmacol. Ther.*, vol. 140, no. 2, pp. 176–185, Nov. 2013.
  - [93] L. Treccani, T. Yvonne Klein, F. Meder, K. Pardun, and K. Rezwani,

- 'Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications', *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7115–7150, Jul. 2013.
- [94] E. Piccinini, C. Bliem, C. Reiner-Rozman, F. Battaglini, O. Azzaroni, and W. Knoll, 'Enzyme-polyelectrolyte multilayer assemblies on reduced graphene oxide field-effect transistors for biosensing applications', *Biosens. Bioelectron.*, vol. 92, pp. 661–667, Jun. 2017.
- [95] R. Ahmad, N. Tripathy, J. H. Park, and Y. B. Hahn, 'A comprehensive biosensor integrated with a ZnO nanorod FET array for selective detection of glucose, cholesterol and urea', *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 60, pp. 11968–11971, Aug. 2015.
- [96] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, and A. Zweck, 'The emerging nanomedicine landscape', *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1211–1217, Oct. 2006.
- [97] H. Liu and T. J. Webster, 'Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools', *Biomaterials*, vol. 28, no. 2, pp. 354–369, Jan. 2007.
- [98] M. L. Y. Sin, K. E. Mach, P. K. Wong, and J. C. Liao, 'Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases.', *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 14, no. 2, pp. 225–44, Mar. 2014.
- [99] S. Lin, X. Jiang, L. Wang, G. Li, and L. Guo, 'Adsorption Orientation of Horse Heart Cytochrome c on a Bare Gold Electrode Hampers Its Electron Transfer', *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 1, pp. 637–642, Jan. 2012.
- [100] C. Díaz, R. C. Salvarezza, M. A. Fernández Lorenzo de Mele, and P. L. Schilardi, 'Organization of *Pseudomonas fluorescens* on Chemically Different Nano/Microstructured Surfaces', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 2, no. 9, pp. 2530–2539, Sep. 2010.
- [101] R. Hansen *et al.*, 'Microstructured Block Copolymer Surfaces for Control of Microbe Adhesion and Aggregation', *Biosensors*, vol. 4, no. 1, pp. 63–75, Mar. 2014.
- [102] S. I. Stupp, 'Self-Assembly and Biomaterials', *Nano Lett.*, vol. 10, no. 12, pp. 4783–4786, Dec. 2010.
- [103] D. Kozlova *et al.*, 'Calcium phosphate nanoparticles show an effective activation of the innate immune response in vitro and in vivo after functionalization with flagellin', *Virol. Sin.*, vol. 29, no. 1, pp. 33–39, Feb. 2014.
- [104] J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, and R. H. Hurt, 'Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces', *ACS Nano*, vol. 4, no. 11, pp. 6903–6913, Nov. 2010.
- [105] K. Vasilev *et al.*, 'Platforms for controlled release of antibacterial agents facilitated by plasma polymerization', *2010 Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, pp. 811–814, Aug. 2010.
- [106] S. Rigo *et al.*, 'Nanoscience-Based Strategies to Engineer Antimicrobial Surfaces', *Advanced Science*, vol. 5, no. 5, p. 1700892, May-2018.
- [107] K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, 'Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 95, no. 2, pp. 299–311, Jul. 2012.

- [108] F. Variola, J. B. Brunski, G. Orsini, P. Tambasco de Oliveira, R. Wazen, and A. Nanci, 'Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives', *Nanoscale*, vol. 3, no. 2, pp. 335–353, Feb. 2011.
- [109] I. Yoda *et al.*, 'Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion', *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 1, Sep. 2014.
- [110] J. Hasan and K. Chatterjee, 'Recent advances in engineering topography mediated antibacterial surfaces', *Nanoscale*, vol. 7, no. 38. Royal Society of Chemistry, pp. 15568–15575, 14-Oct-2015.
- [111] R. Konradi, C. Acikgoz, and M. Textor, 'Polyoxazolines for nonfouling surface coatings - A direct comparison to the gold standard PEG', *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, no. 19. pp. 1663–1676, 15-Oct-2012.
- [112] I. Banerjee, R. C. Pangule, and R. S. Kane, 'Antifouling coatings: Recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms', *Advanced Materials*, vol. 23, no. 6. pp. 690–718, 08-Feb-2011.
- [113] C. Y. Flores, A. G. Miñán, C. A. Grillo, R. C. Salvarezza, C. Vericat, and P. L. Schilardi, 'Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 8, pp. 3149–3159, 2013.
- [114] K. C. L. Black, T. S. Sileika, J. Yi, R. Zhang, J. G. Rivera, and P. B. Messersmith, 'Bacterial killing by light-triggered release of silver from biomimetic metal nanorods', *Small*, vol. 10, no. 1, pp. 169–178, 2014.
- [115] B. Hu, N. Wang, L. Han, M. L. Chen, and J. H. Wang, 'Core-shell-shell nanorods for controlled release of silver that can serve as a nanoheater for photothermal treatment on bacteria', *Acta Biomater.*, vol. 11, no. 1, pp. 511–519, 2015.
- [116] H. Wang, J. Yi, S. Mukherjee, P. Banerjee, and S. Zhou, 'Magnetic/NIR-thermally responsive hybrid nanogels for optical temperature sensing, tumor cell imaging and triggered drug release', *Nanoscale*, vol. 6, no. 21, pp. 13001–13011, Nov. 2014.
- [117] C. Y. Flores *et al.*, 'Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 350, no. 2, pp. 402–408, 2010.
- [118] F. Ghilini, D. E. Pissinis, A. Miñán, P. L. Schilardi, and C. Diaz, 'How Functionalized Surfaces Can Inhibit Bacterial Adhesion and Viability', *ACS Biomater. Sci. Eng.*, p. acsbiomaterials.9b00849, Sep. 2019.
- [119] D. E. Pissinis, G. A. Benítez, and P. L. Schilardi, 'Two-step biocompatible surface functionalization for two-pathway antimicrobial action against Gram-positive bacteria', *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 164, pp. 262–271, Apr. 2018.
- [120] M. Hoyos-Nogués, J. Buxadera-Palomero, M. P. Ginebra, J. M. Manero, F. J. Gil, and C. Mas-Moruno, 'All-in-one trifunctional strategy: A cell adhesive, bacteriostatic and bactericidal coating for titanium implants', *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 30–40, Sep. 2018.
- [121] M. Hoyos-Nogués, F. Velasco, M. P. Ginebra, J. M. Manero, F. J. Gil, and C. Mas-Moruno, 'Regenerating Bone via Multifunctional Coatings: The Blending of Cell Integration and Bacterial Inhibition Properties on the Surface of Biomaterials', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 26, pp. 21618–21630, 2017.

- [122] Q. Yu, Y. Zhang, H. Wang, J. Brash, and H. Chen, 'Anti-fouling bioactive surfaces', *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1550–1557, Apr. 2011.
- [123] T. Hanawa, 'A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium', *Journal of Periodontal and Implant Science*, vol. 41, no. 6. pp. 263–272, Dec-2011.
- [124] K. W. Johnson, 'Reproducible electrodeposition of biomolecules for the fabrication of miniature electroenzymatic biosensors', *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 5, no. 1–4, pp. 85–89, 1991.
- [125] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo, 'Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, no. 1, pp. 321–335, Jan. 1989.
- [126] A. Ulman, 'Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers', *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1533–1554, Jan. 1996.



# **Capítulo 2:**

## **Técnicas de**

### **Caracterización**

### **Fisicoquímica**



En este capítulo se describirán los fundamentos de las técnicas utilizadas para la caracterización de los sistemas estudiados en el trabajo de tesis.

## **2.1 Técnicas de análisis de superficies**

### **2.1.1 Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)**

En las últimas décadas, las microscopías de barrido por sondas (SPM) han sido las más utilizadas a la hora de caracterizar superficies sólidas de diversos tipos de materiales tales como metales, semiconductores, polímeros, y también materiales depositados sobre sustratos sólidos. Estas técnicas poseen una alta resolución, permitiendo en muchos casos estudiar la materia a nivel atómico o molecular. Su funcionamiento se basa en la interacción entre una punta de prueba y la muestra, que depende de la distancia de separación entre ellas. Dentro de las SPMs, las más difundidas son la microscopia de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM); esta última fue utilizada durante la realización del presente trabajo de tesis.

La ventaja principal de las técnicas SPM radica en que son técnicas no destructivas, ya que no se requiere generalmente una preparación previa de la muestra, simplemente un soporte donde fijarla. Además, permiten realizar medidas en diversas condiciones ambientales como en vacío, al aire y en líquidos, a diferentes temperaturas, etc. lo que posibilita su utilización para el análisis de diversos sistemas, tales como el monitoreo de reacciones o la caracterización de muestras biológicas en estado nativo, entre otros.

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés, *atomic force microscope*) constituye, hoy en día, una herramienta estándar de caracterización de superficies a escalas atómicas y moleculares, en diversas áreas que van desde la bioquímica hasta la ciencia de materiales. Fue desarrollado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber, y, al igual que otros microscopios de barrido con sonda, el AFM barre o “escanea” la superficie de una muestra mediante una sonda aguda y registra los cambios de la fuerza de interacción existente entre la punta de la sonda y la muestra. En particular, lo que caracteriza especialmente al AFM es que proporciona información tridimensional en las coordenadas X, Y y Z de una superficie con una precisión nanométrica. Además, pueden obtenerse imágenes de diversos materiales, desde moléculas de ADN o cromosomas [1], proteínas, nanopartículas [2], células [3], hasta polímeros o materiales cerámicos [4].

### *Fundamento de la técnica:*

El microscopio trabaja barriendo con una punta la superficie de un sustrato y registrando una serie de puntos X, Y y Z que luego son procesados para construir una imagen. De esta imagen se puede obtener diversa información, como la rugosidad superficial, la altura de capas o identificación de defectos, la forma y la distribución de los objetos o de las estructuras encontradas en la superficie, etc. Adicionalmente, permite la medida cuantitativa de diferentes propiedades de los materiales, como, por ejemplo, la respuesta mecánica bajo fuerzas de compresión con resolución en el rango de los piconewtons, la detección y presencia de dominios magnéticos, diferencias en la composición química de zonas en la superficie (medida de fase), etc.

Las fuerzas de interacción que actúan entre la punta y la muestra se representan con el modelo de Lennard-Jones, en el que un par de átomos o moléculas están sujetos a dos tipos de fuerzas de interacción distintas, dependiendo de si se encuentran separados por una distancia grande o pequeña. A grandes distancias actúan las fuerzas atractivas (van der Waals) y a distancias pequeñas adquieren importancia las fuerzas repulsivas (repulsión de Pauli). Entonces, el modelo propone que la energía potencial de un par de átomos se rige por la siguiente ecuación:

$$V(r) = 4\epsilon[(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6] \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde  $r$  es la distancia de separación entre átomos,  $\epsilon$  es la mínima energía potencial y  $\sigma$  es el diámetro molecular efectivo. El término  $(\sigma/r)^{12}$  tiene en cuenta la repulsión entre átomos cuando éstos se aproximan ( $r$  tendiendo a cero) y se basa en el principio de exclusión de Pauli, que considera que cuando un par de átomos se aproximan, sus nubes electrónicas comienzan a solaparse, aumentando exponencialmente la energía del sistema y las fuerzas repulsivas del mismo. Por otra parte, el término  $(\sigma/r)^6$  representa las fuerzas de tipo van der Waals, las cuales predominan a distancias más largas (figura 2.1).

En el caso del AFM, la ecuación de Lennard-Jones se puede reformular para describir la interacción entre la punta del cantilever y la superficie de la muestra, manteniéndose la misma dependencia con  $r$  [5]. Cuando la distancia entre estas es grande predominan las fuerzas atractivas, y, por el contrario, si la distancia es muy pequeña predominan las fuerzas repulsivas [6].

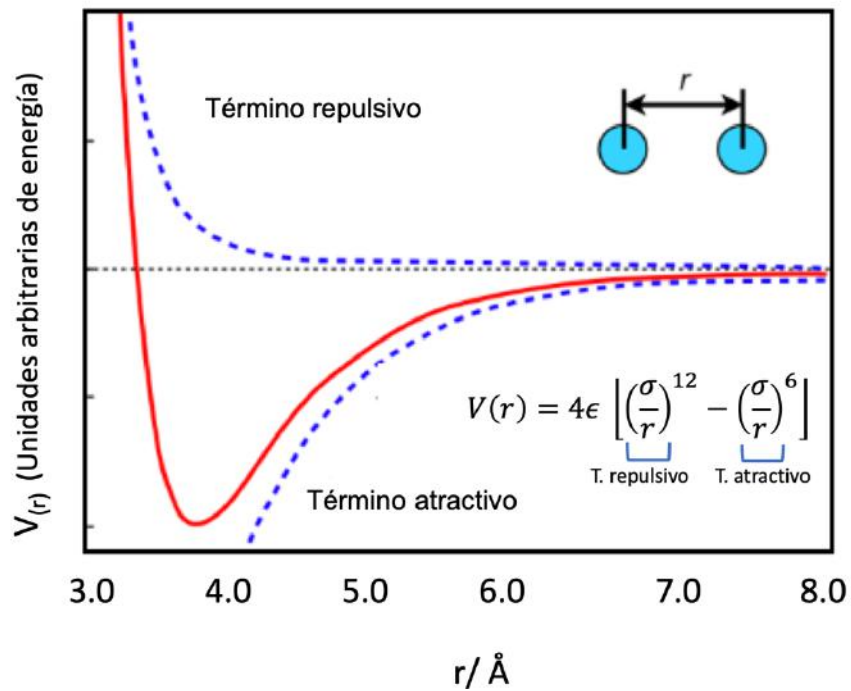


Figura 2.1: Esquema representativo del potencial de Lennard-Jonnes en función de la distancia entre dos átomos, donde se muestran las contribuciones de atracción y repulsión.

Para proceder a realizar la medida, la muestra es montada en el extremo del dispositivo de barrido. Las fuerzas de interacción experimentadas por el sistema punta-muestra, son medidas mientras la muestra se acerca la punta mediante el registro de la deflexión de un cantiléver donde está montada dicha punta (figura 2.2). La fuerza entre la punta y la superficie de la muestra es muy pequeña, normalmente menos de  $10^{-9}$  N, y es muy difícil de medir. Por esta razón, el sistema de detección registra la deflexión del cantiléver como una medida indirecta de estas fuerzas. Así, la variación espacial de las fuerzas repulsivas o atractivas punta-muestra (deflexión del cantiléver) o la altura de la punta es convertida en una imagen. Cuando la fuerza es atractiva, el cantiléver se dobla hacia la superficie (punto 2 en la figura 2.2), y lo hace en sentido contrario cuando la interacción es repulsiva.

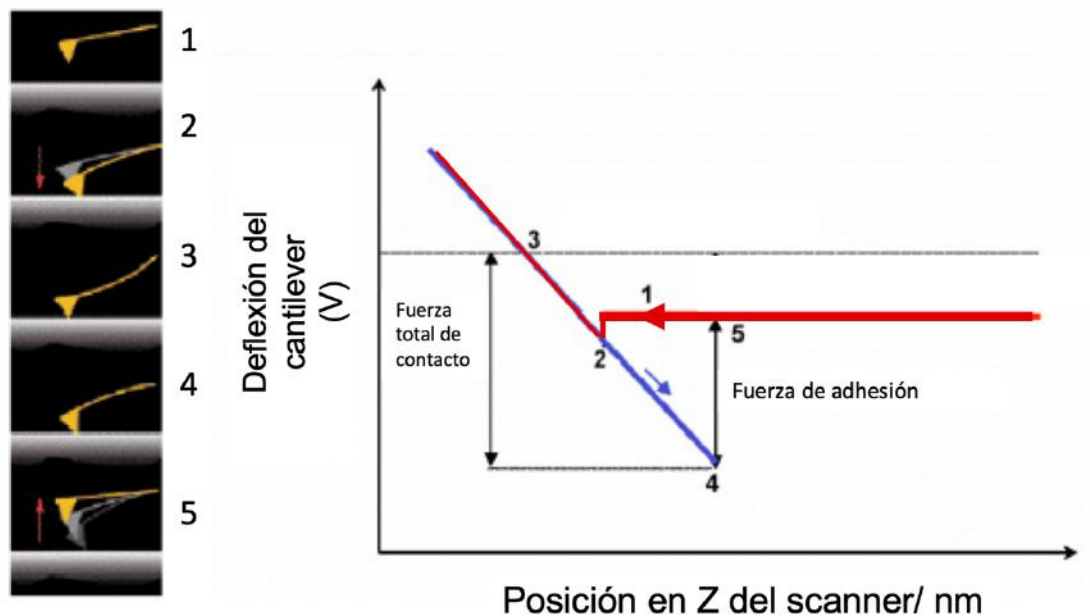


Figura 2.2: representación de la deflexión del cantilever (en Volts), en función de la distancia o posición del scanner. En rojo se señala el proceso de acercamiento (1 y 2) de la punta a la superficie, correspondiente al cuadro 1 y 2 de deflexión del cantilever. El punto 3 corresponde al contacto punta-muestra, y la línea azul representa el retroceso del cantilever (4 y 5).

#### *Instrumentación:*

El AFM consta, básicamente, de una cabeza óptica que contiene una ventana en la parte superior, espejos, un diodo láser y un fotodetector (figura 2.3 A). La punta de prueba está unida a un cantiléver. Adosado al cabezal óptico se encuentra un dispositivo de barrido (scanner) que contiene al cilindro piezoeléctrico y permite el movimiento de la muestra respecto de la punta situada en la cabeza óptica (figura 2.3 A). Estos escáneres se caracterizan por tener tres grados de libertad (x, y, z), expandiéndose en una dirección y contrayéndose en otra como resultado del voltaje aplicado a sus electrodos, y también por tener un rango de barrido discreto (el cual depende del tipo de material piezoeléctrico, sus dimensiones y el voltaje aplicado). El mayor intervalo de operación de un escáner es de  $\approx 100$  micras en movimiento lateral y  $\approx 10$  micras en movimiento vertical. Los sistemas de control y aislamiento de vibración son similares para la mayoría de SPM's [7]. La figura 2.3 B muestra el recorrido que hace el láser para la adquisición de las imágenes topográficas.

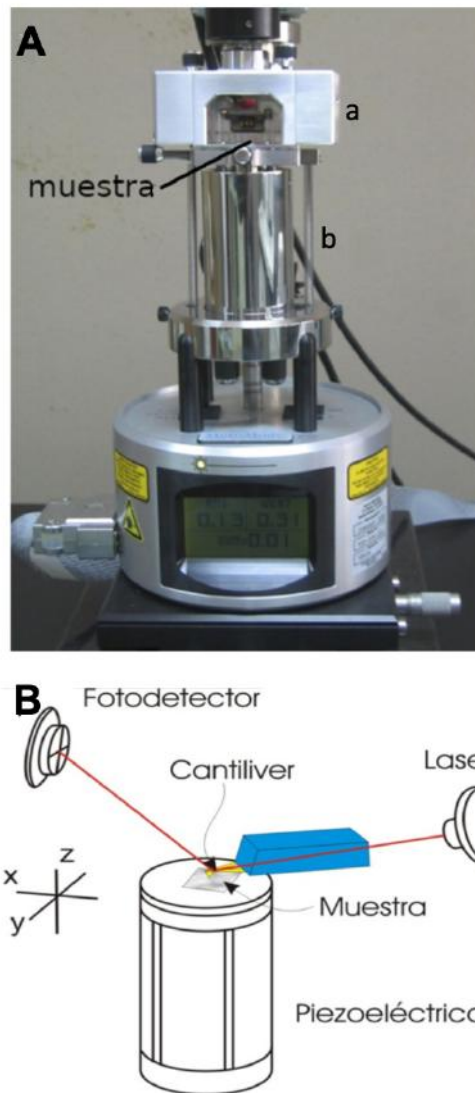


Figura 2.3: A:Fotografía del AFM utilizado en este trabajo. a) cabezal óptico que contiene la fuente láser y el fotodetector. b) cilindro piezoeléctrico (scanner) donde se coloca la muestra. B: esquema del barrido topográfico de una muestra.

En este trabajo de tesis se utilizó un microscopio Multimode controlado por una unidad Nanoscope V (Bruker, Santa Bárbara, CA, USA). Las puntas usadas fueron de nitruro de silicio montadas en un cantiléver con una constante elástica de  $k = 42 \text{ N/m}$ .

### **2.1.1.1 Estilos de cantiléver:**

La geometría de las puntas utilizadas es un punto crítico en la calidad de las imágenes obtenidas. Como puede verse en la figura 2.4 A, la forma de la punta puede producir artefactos en las imágenes obtenidas al no copiar fielmente la topografía de la superficie. A lo largo de los años se han desarrollado diversas formas de fabricación para optimizar su forma y reproducibilidad [4]. Las puntas están soportadas en el extremo del cantiléver, que se deflexa según la topografía de la muestra (figura 2.4 B). El cantilever tiene una superficie reflectante (en general es una capa de oro o de aluminio) para poder detectar los movimientos y/o deflexiones del mismo a través del laser que incide en su parte superior cuando la punta barre la superficie de una muestra. La magnitud esta deflexión está relacionada con la fuerza de interacción punta-muestra (F) a través de la expresión  $F=k.z$ , donde k es la constante elástica o constante de fuerza del cantiléver y z la deflexión del mismo. La constante k, junto con la forma de la punta son parámetros de suma importancia en mediciones de AFM, ya que un cantiléver inadecuado o una punta defectuosa pueden producir una imagen distorsionada o daño en muestras blandas. Los cantilévers comúnmente utilizados para mediciones de AFM son integrados de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ó Si. Éstos son preparados con diferentes longitudes, espesores y formas que permiten diferentes tipos de mediciones y aplicaciones a distintos tipos de muestras (figura 2.4). Los cantilevers con constantes de fuerza pequeñas son más adecuados para obtener imágenes de materiales blandos (como polímeros, células, etc), mientras que los cantilevers con constantes de fuerza grandes son generalmente requeridos para monitorear las propiedades nanomecánicas de las muestras. La figura 2.5 muestra los perfiles obtenidos con puntas de diferente grosor, donde se ve que puntas más robustas tienen menor resolución lateral. Así mismo, la elección del cantiléver dependerá del modo de operación del microscopio (ver sección siguiente)



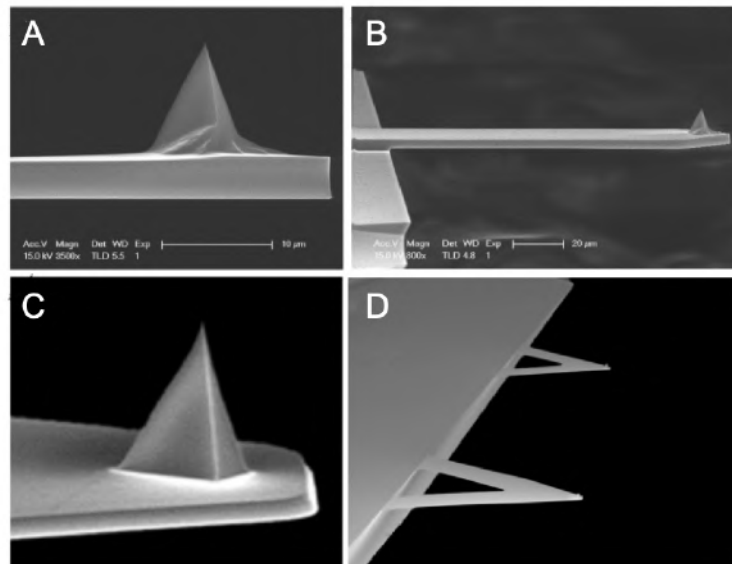


Figura 2.4: Diferentes tipos de puntas y cantilevers. A: punta piramidal, B: cantiléver rectangular utilizado en modo *tapping*; C y D punta piramidal en cantiléver triangular, utilizado en modo contacto

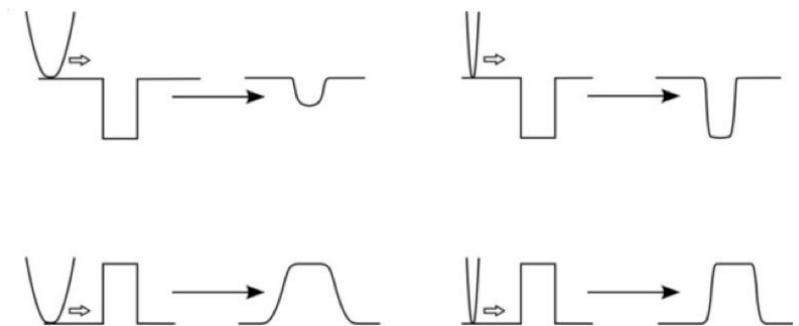


Figura 2.5: Comparación de perfiles obtenidos con puntas “gruesas” (izq) o “finas” (der) en superficies cóncavas (arriba) o convexas (abajo).

### 2.1.1.2 Modos de operación del AFM:

El AFM utiliza múltiples modos de operación de acuerdo con las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir. Se definen en base a la interacción punta-muestra, es decir, dependiendo el régimen de fuerzas aplicadas, ya sean repulsivas, atractivas o una combinación de ellas.

- Modo Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie.

- **Modo *Tapping*:** También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.
- **Modo No contacto:** Mide la topografía de acuerdo con las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta sin entrar en contacto entre sí, manteniendo la distancia punta-muestra constante. A continuación, se explican más detalladamente los modos utilizados en el presente trabajo de tesis:

#### **AFM modo contacto:**

En la medida en modo contacto (figura 2.6, izquierda), la punta se mantiene en contacto con la superficie. Este modo permite obtener dos tipos de imágenes: topográficas y de deflexión. En el modo topográfico, se registran las variaciones locales de altura mientras la fuerza de interacción entre punta y muestra se mantiene constante. En el modo de deflexión, se registra la deflexión del cantiléver, mientras que la altura de la sonda de escaneo se mantiene constante. Las imágenes topográficas brindan información cuantitativa de la topografía superficial de la muestra y las imágenes en modo deflexión en general exhiben mejor contraste de los detalles morfológicos.

#### **AFM modo intermitente (*tapping*):**

En el modo *tapping* (figura 2.6, derecha) se aplica una señal sinusoidal, que hace oscilar la punta a su frecuencia de resonancia. Los barridos se efectúan a una amplitud de oscilación constante, de entre 1-100 nm, denominada amplitud de trabajo o *setpoint* [6]. El escáner de barrido sube y baja la altura del cantiléver para mantener esa amplitud constante en todo momento. Este movimiento vertical proporciona la imagen topográfica (imagen de alturas) [8]. Este modo es uno de los más utilizados para la obtención de imágenes AFM, sobre todo cuando las superficies son frágiles o muy blandas (como células, polímeros, etc), ya que no hay riesgo de dañar la muestra y evita artefactos en la imagen.

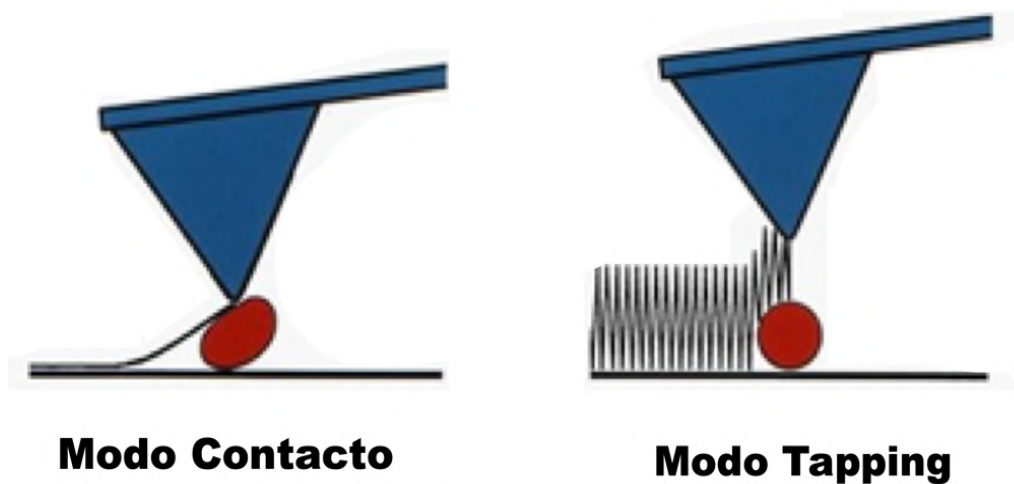


Figura 2.6: Representación de la interacción cantilever-superficie en modo Contacto o *Tapping* (Intermitente).

En la tabla 2.1 se resumen las ventajas y desventajas de estos dos modos de operación.

Tabla 2.1: principales ventajas y desventajas de los modos Contacto e Intermitente.

Modo de trabajo	Ventajas	Desventajas
<b>Contacto</b>	Altas velocidades de barrido. Resolución atómica.	Fuerzas laterales pueden distorsionar la imagen. Muestras blandas pueden dañarse.
<b><i>Tapping</i></b>	Mayor resolución lateral (1-5 nm). Menor interacción con la muestra, menor daño en muestras blandas.	Menor velocidad de barrido

Por otra parte, por efecto de la interacción de la punta con los distintos constituyentes de la muestra, se produce un cambio en la fase de la onda sinusoidal aplicada, es decir, un desfase. El registro de este desfase permite obtener la denominada imagen de fase. El cambio en la fase de la señal sinusoidal está relacionado con las propiedades mecánicas y viscoelásticas del material bajo observación. Por ello, la denominada imagen de fase permite obtener información acerca de los constituyentes de la muestra. Al aplicar una señal sinusoidal con una cierta frecuencia, el tiempo de interacción y las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra son menores que en el caso de un contacto continuo. Además, a esto se suma la mayor sensibilidad para el estudio composicional de la muestra.

### **2.2.1.3 Medidas de Rugosidad superficial**

La rugosidad superficial puede definirse como “las finas irregularidades en la textura superficial que resultan en general inherentes al proceso de fabricación del material” [9]. Sin embargo, la rugosidad puede ser intencionalmente manipulada para alcanzar algún objetivo determinado.

Los parámetros más utilizados para analizar la rugosidad son [10]:

La rugosidad promedio ( $R_a$ ), que representa la desviación promedio de los valores absolutos de las irregularidades superficiales ( $y_i$ ) desde la línea media (figura 2.8).

Este parámetro es fácil de determinar y brinda una descripción general sobre las variaciones de alturas de la muestra. No es útil para describir la ondulación y no es sensible a pequeños cambios en el perfil superficial.

La ecuación que se utiliza para calcular  $R_a$  es la siguiente:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad \text{Ec.2.2}$$

Donde  $n$  es el número de segmentos en los que se divide el eje X (I en figura 2.7).

La rugosidad cuadrática media o RMS ( $R_q$ ), que representa la desviación estándar de alturas promedio. Describe estadísticamente la rugosidad superficial y es más sensible que  $R_a$ . Se calcula de la siguiente forma:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad \text{Ec.2.3}$$

Estos parámetros pueden ser calculados tanto en imágenes 2D como 3D con la utilización del programa provisto por el fabricante del microscopio. a mayor rugosidad de la muestra, mayor es el valor de ambos índices [11].

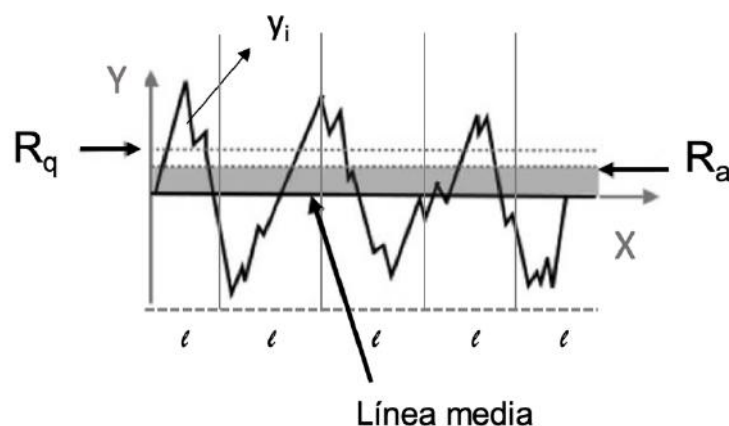


Figura 2.7. Representación de la rugosidad promedio ( $R_a$ ) y de la RMS ( $R_q$ )

En el presente trabajo se utilizó el valor de  $R_q$  para comparar la rugosidad de las superficies de titanio modificadas y sin modificar.

### 2.1.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) un haz de electrones es acelerado y enfocado sobre una muestra de manera tal de pasar a través de ella, generando señales directamente relacionadas con su estructura y morfología. La interacción entre el haz incidente y los átomos de la muestra produce electrones dispersados que son captados por un detector para construir una imagen en dos dimensiones. De acuerdo a la interacción que se produzca entre el haz de electrones y la muestra, los electrones pueden, además, atravesarla. La dispersión de los electrones puede producirse de dos formas:

*Elástica:* los electrones no pierden energía en la interacción. Esta interacción se suele producir para ángulos de entre  $1^\circ$  y  $10^\circ$  y para bajas energías. El conjunto de electrones resultantes suelen ser coherentes (respecto a su carácter ondulatorio, la coherencia indica la alineación de las longitudes de onda de un conjunto de ondas). La dispersión elástica pierde coherencia a medida que el ángulo sobrepasa los  $10^\circ$ . Los

electrones dispersados elásticamente suponen la mayor fuente de contraste en el TEM, y también crean la mayor parte de la intensidad de los patrones de difracción.

*Inelástica:* los electrones pierden energía en la interacción. Se suele producir para ángulos pequeños, menores a  $1^\circ$ , y para electrones de alta energía. El paquete de electrones resultante suele ser incoherente. Este tipo de interacción es interesante en cuanto a la información que aporta sobre la composición química de la muestra, que no se puede obtener a partir de los electrones dispersados elásticamente.

Los electrones no desviados y desviados elásticamente son los responsables de la formación de la imagen en TEM. Por el contrario, la fracción de electrones inelásticos cede energía a la muestra al incidir sobre ella y provocan el ruido de fondo presente en las imágenes.

Por otra parte, mediante esta microscopía se puede obtener información acerca del patrón de difracción de electrones provocado por la estructura de la muestra. Esto se debe a que se producen interferencias en el frente de las ondas transmitidas por la muestra, las cuales son refractadas por una lente en el plano focal posterior originando una imagen de difracción. El TEM presenta dos ventajas con respecto a otras microscopías: primero, posee un factor de magnificación de 50 a  $10^6$  veces y segundo, posee la capacidad de proporcionar una imagen e información acerca del patrón de difracción de la muestra en una misma medida. Las muestras para observar por esta técnica deben tener espesores menores a 200 nm para que los electrones puedan atravesarla.

#### *Instrumentación.*

El TEM está compuesto por las siguientes partes: un cañón de electrones, un sistema de lentes magnéticas y una pantalla fluorescente (figura 2.8). Los componentes están ensamblados en una columna vertical, la que se encuentra en condiciones de alto vacío (entre  $10^{-3}$  y  $10^{-7}$  Torr). El cañón de electrones es la fuente emisora del haz de electrones que está ubicado en la parte superior de la columna, donde se aceleran los electrones al aplicar voltajes de 100 a 1000 kV, para luego ser enfocados por las lentes. El sistema de lentes electromagnéticas está formado por las lentes objetivo, las lentes condensadoras y las lentes proyectoras. Éstas consisten en dos lentes, una que proyecta la imagen del punto de entrecruzamiento que es magnificado y otra que controla el diámetro y ángulo de convergencia del haz que incide sobre la muestra. La lente objetivo forma la primera imagen, localizada debajo de la muestra u objeto, y es

considerada el componente más importante del microscopio porque es la que determina la resolución final del microscopio y además influye en la corrección de las aberraciones (figura 2.8)[12].

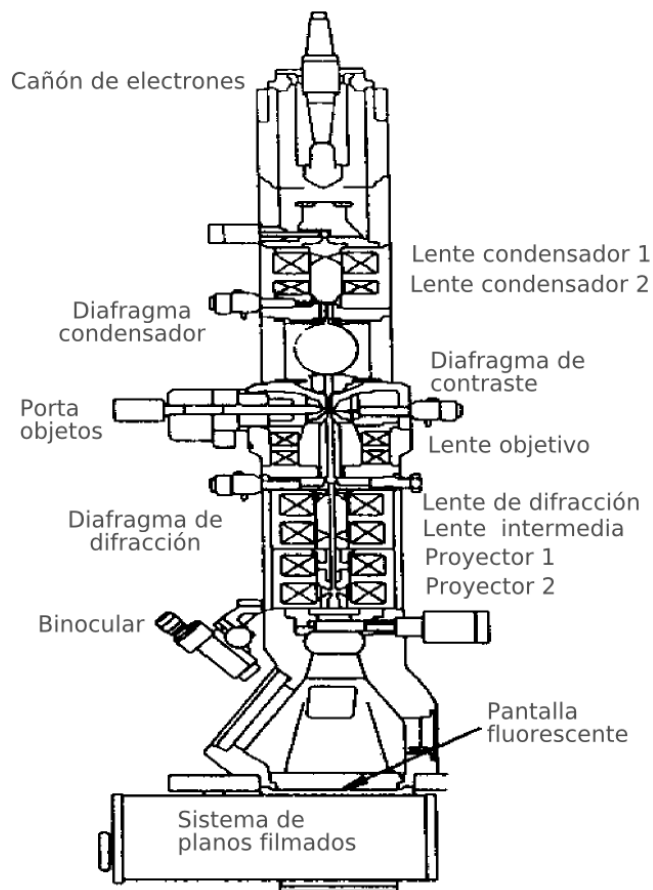


Figura 2.8: Esquema de las partes de un microscopio de transmisión.

La alta magnificación y resolución de los equipos de TEM son el resultado de las pequeñas longitudes de onda,  $\lambda$ , asociadas a los electrones efectivos, que siguen la relación de De Broglie:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0V}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde  $m$  es la masa del electrón,  $h$  es la constante de Planck y  $V$  es la variación de potencial a través de la cual se aceleraron los electrones. Así, cuanto mayor sea el voltaje aplicado, mayor será la aceleración de los electrones y menor la  $\lambda$ , alcanzándose mayor resolución lateral.

Una desventaja que se asocia a esta técnica es su limitada resolución de profundidad ya que los electrones dispersados desde la muestra tridimensional son transformados en una imagen en dos dimensiones [13][14].

Algunos TEM de alta resolución (HRTEM) alcanzan una resolución de 0,2 nm. Las imágenes se construyen mediante el contraste de fase de la onda de los electrones, producido por la interferencia de las fases de las ondas de los electrones incidentes cuando son transmitidos a través de la estructura cristalográfica de la muestra. La información que proporciona el HRTEM es complementaria con los datos de difracción de electrones, brindando información cristalográfica de una muestra a escala atómica [15]. Mediante esta técnica se puede obtener información cualitativa acerca del ordenamiento y la estructura atómica de la muestra, lo que resulta muy útil para el estudio de nanoestructuras.

En esta tesis se utilizaron los servicios de microscopía TEM de Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, y del servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de la Laguna (SEGAI), en Tenerife, España.

### **2.1.3 Microscopia Electronica (SEM)**

#### *Fundamento de la técnica*

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización superficial. Se basa en el principio de la microscopia óptica en la que al igual que el microscopio de transmisión, se sustituye el haz de luz por un haz de electrones, consiguiendo resoluciones desde 1nm hasta los 0,4 nm , en aquellos SEM de ultra alta resolución, muy superior a cualquier otro instrumento óptico [16], [17].

Su funcionamiento consiste en hacer incidir un haz de electrones que barre sobre la muestra. La muestra debe ser conductora; si no lo es, se recubre con una capa conductora muy fina de oro o carbón para otorgarle propiedades conductoras [18].



Cuando el haz de electrones alcanza la superficie de la muestra se generan principalmente electrones retrodispersados y electrones secundarios, además de radiación electromagnética (rayos X). Los electrones secundarios son electrones que han sido dispersados inelásticamente por la interacción de los electrones del haz incidente con la muestra. Están caracterizados por una energía baja del orden de los 20-50 eV. Los electrones retrodispersados son los electrones del haz incidente que han sido dispersados en forma elástica por los átomos de la muestra. Su energía es próxima a la del haz incidente (10-30 keV) y se originan en zonas más profundas del volumen de interacción. Estos electrones son colectados para formar la imagen de la superficie.

### *Instrumentación*

Todos los microscopios electrónicos de barrido constan de un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de  $10^{-5}$  mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía. Este haz es colimado por una serie de lentes electrónicas y focalizado sobre la muestra analizada (figura 2.9). Los detectores registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, que son procesadas y visualizadas en la pantalla de una computadora. El cañón electrónico es el primer componente de la columna del microscopio y es el que produce el haz de electrones. Consta de un filamento emisor de electrones que son luego acelerados por un ánodo polarizado positivamente a una tensión variable entre unos 5 y 30 kV. La tensión de aceleración del haz, del orden de los 30 kV, determina la energía con la cual inciden los electrones sobre la muestra y por lo tanto las dimensiones del volumen de interacción. Los electrones de mayor energía pueden penetrar más en la muestra y pueden generar señales originadas a mayores profundidades.

Los experimentos de Microscopia electrónica se llevaron a cabo utilizando un Microscopio SIGMA de Alta Resolución (Carl Zeiss) basado en una columna GEMINI, que cuenta con una fuente de emisión de alto brillo Schottky, un colimador de rayo, y un detector secundario. El mismo se encuentra en la Universidad de Pavía, en el departamento de Geología. Las medidas fueron realizadas sobre los sustratos previamente cubiertos con Pt, con un potencial de aceleración de 1.5kV y una distancia de trabajo de aproximadamente 3mm.

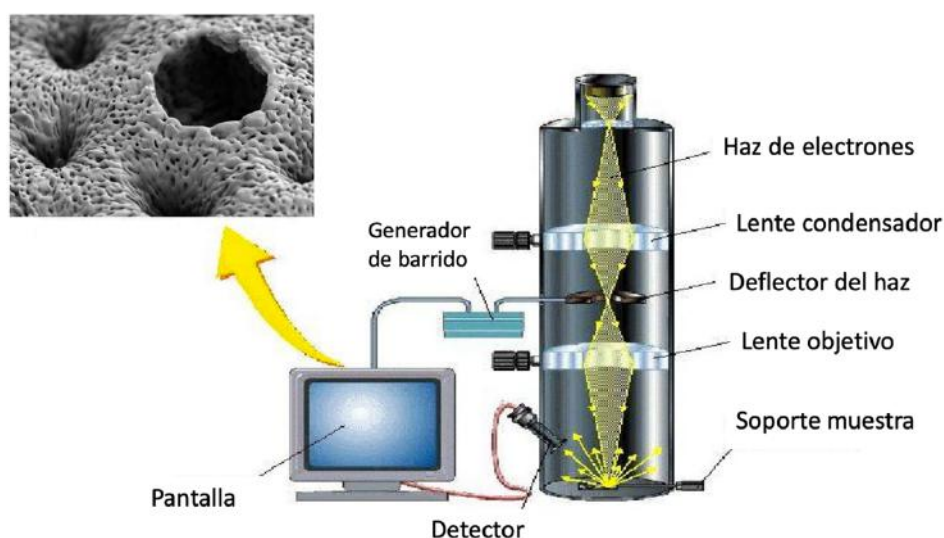


Figura 2.9: esquema representativo de los componentes de un microscopio electrónico de barrido.

#### 2.1.4 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es el método de caracterización de superficies más utilizado hoy en día por el alto contenido de información que suministra y la flexibilidad para ser utilizada en una gran variedad de muestras. La técnica XPS forma parte de las técnicas analíticas de espectroscopías electrónicas, denominadas de este modo porque se detectan electrones.

##### *Fundamento de la técnica*

La incidencia de un fotón de energía sobre los átomos situados más superficialmente en la muestra provoca, por efecto fotoeléctrico, la emisión de fotoelectrones con una determinada energía de ligadura dada por la Ec. 2.5:

$$EB = h\nu - E_K - W \quad \text{Ec. 2.5}$$

Donde  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia de la radiación incidente y  $h\nu$  es la energía de los fotones;  $E_K$  es la energía cinética del fotoelectrón producido,  $W$ , la función de trabajo del espectrómetro y  $EB$ , la energía de enlace de los electrones. Este último parámetro identifica al electrón de forma específica, en términos del elemento y nivel atómico involucrado y depende del entorno químico del átomo analizado y de su estado de oxidación, entre otros [19]. Una vez que se ha emitido el

fotoelectrón, el átomo se relaja, emitiendo un fotón o un electrón (electrón Auger). En la figura 2.10 se muestra el fenómeno de emisión de fotoelectrones.

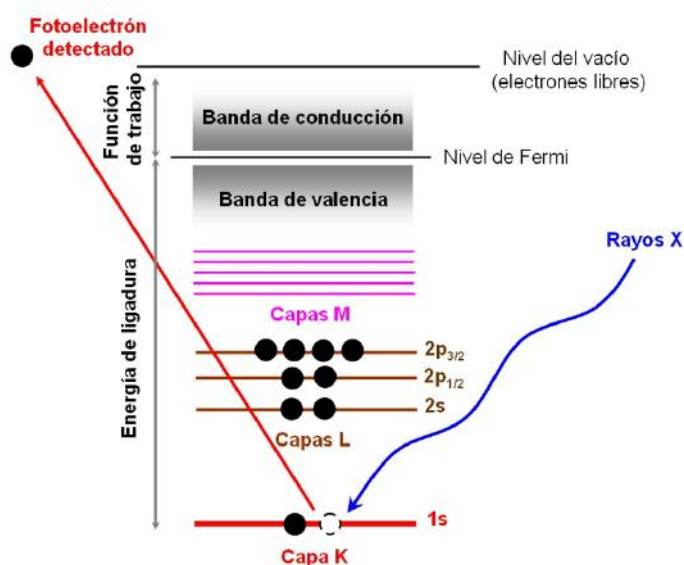


Figura 2.10: Fundamento de la técnica XPS

El análisis XPS de una superficie puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, exceptuando H y He. Con aplicaciones más sofisticadas de la técnica se obtiene información detallada de la química, organización y morfología de la superficie. Se consigue una penetración de hasta 10 nm desde la superficie de la muestra y tiene diversas aplicaciones:

- Identificación de todos los elementos presentes (excepto H, He) en concentraciones mayores al 0.1%.
- Determinación semicuantitativa de la composición elemental de la superficie (error <  $\pm 10\%$ ).
- Información acerca del entorno molecular: estado de oxidación, átomos enlazantes, orbitales moleculares, etc.
- Información sobre estructuras aromáticas o insaturadas a partir de las transiciones  $\Pi^* \rightarrow \Pi$ .
- Perfiles de profundidad de 10 nm no-destructivos y destructivos de profundidades de varios cientos de nanómetros.

### *Instrumentación.*

Los componentes principales de un equipo de XPS son el sistema de vacío (UHV en figura 2.11), la fuente de rayos X, un analizador de energía del electrón y un sistema de datos. La parte central del equipo lo constituye la cámara principal de vacío en la que la muestra es analizada. La realización del experimento en condiciones de vacío se debe a varios factores entre los que se pueden mencionar

- Los fotoelectrones han de viajar desde la muestra hasta el detector sin colisionar con ninguna partícula de fase gaseosa
- Algunos componentes tales como la fuente de rayos X requieren condiciones de vacío para mantener la operatividad.
- La composición superficial de la muestra ha de permanecer invariable durante el experimento.

Las muestras son introducidas en una primera cámara donde se procede a vaciar la atmósfera existente hasta lograr un vacío de  $10^{-6}$  torr, este paso puede llevar entre varios minutos y horas. La colocación de la muestra en el interior de la cámara se realiza mediante una barra unida a un portamuestras. Dentro de la cámara principal, la muestra puede ser orientada en distintas posiciones y se puede elegir la zona de la superficie a trabajar.

Las fuentes de rayos X más utilizadas son las que emplean ánodos de Al o Mg, otros ánodos son Si, Zr, Ag, Ti, Cr. La radiación X es monocromatizada antes de llegar a la muestra mediante el uso de un cristal de cuarzo. Esto permite aprovechar el rango de energía en que la intensidad de la radiación X es máxima (normalmente un ancho de 1 – 2 eV), evitar los picos satélites de fluorescencia de rayos X, e impedir que electrones de alta energía provoquen golpes de calor a la muestra y la degraden.

El área de muestra que puede ser irradiada por los rayos X varía entre zonas circulares de unos pocos centímetros de diámetro hasta unas 50 micras. Esta focalización depende de la geometría de la fuente y del tipo de cañón de electrones utilizado para estimular la emisión de rayos X. La utilización de un monocromador disminuye la intensidad de rayos X que alcanzan a la muestra. Esta disminución en el flujo energético es compensada en el sistema analizador, constituido por lentes eficaces de captación de radiación, un analizador de energía y un sistema detector multicanal.

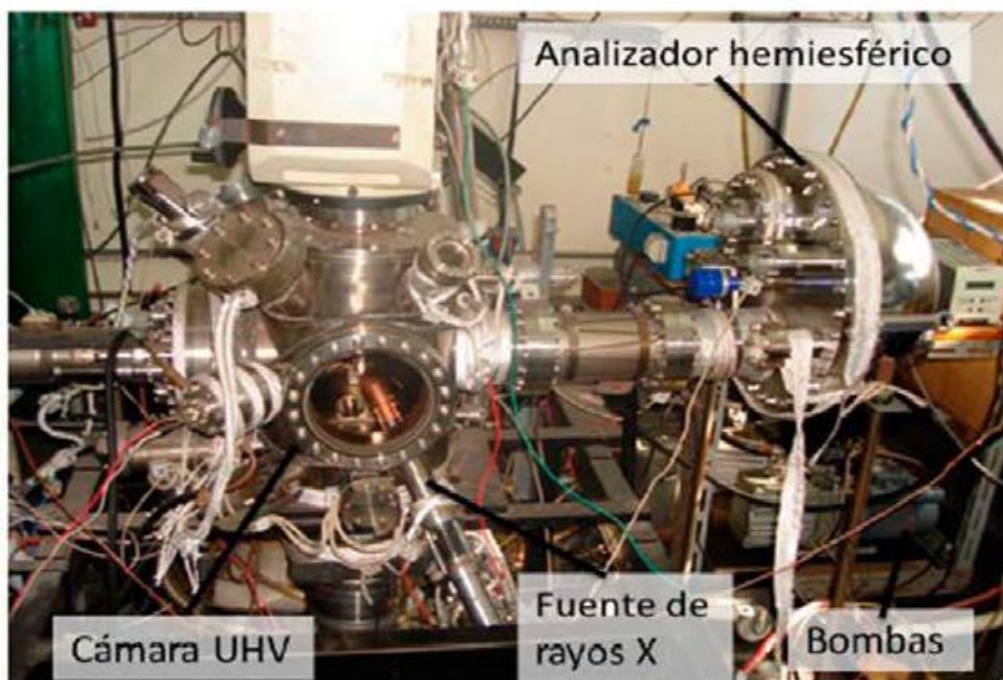


Figura 2.11: Imagen del XPS del Laboratorio de Nanoscopías y Fisicoquímica de Superficies del INIFTA.

Las medidas XPS del presente Trabajo de Tesis se llevaron a cabo en el INIFTA y estuvieron a cargo del Dr. Guillermo A. Benitez. La fuente de rayos X está constituida por una lámina de Al K $\alpha$  que actúa como ánodo y que se bombardea con electrones (XR50, SpecsGmbH). La energía de los rayos X blandos emitidos en estas condiciones es 1486,6 eV con un ancho de banda de 0,85 eV. La medida de la energía de los electrones eyectados se realizó mediante el análisis de su deflexión en un campo electrostático. El analizador hemiesférico (PHOIBOS 100, SpecsGmbH) aplica un potencial a través de dos sectores concéntricos y los electrones pasan sin cambio de energía a lo largo de líneas equipotenciales. Como sistema de detección se empleó un multiplicador de electrones *channeltron*. La calibración de la escala de energía se realizó con dos puntos utilizando oro evaporado (EB Au4f7/2 = 84,00 eV) y cobre (EB de Cu2p3/2 = 932,66 eV) como patrones de referencia. La deconvolución de los espectros se realizó utilizando el programa XPS Peak 4.1 sobre los espectros tomados en alta resolución. En primer lugar se trazó una línea de base en el espectro tipo Shirley. Los parámetros para Ag 3d fueron: desdoblamiento spin-órbita (S.O.S) de 6,01 eV, FWHM  $\approx$  1 eV y 50% de producto de Gaussianas-Lorentzianas (% de GL). Para el Ti 2p se

utilizó un S.O.S de 5,8 eV; FWHM  $\approx$  1 eV y 50% de GL. El N 1s se parametrizó con un FWHM  $\approx$  1.5 eV, y en el caso del C1s el FWHM  $\approx$  1 eV.

#### **2.1.4 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

La espectroscopía de Infrarrojo es una de las técnicas espectroscópicas más versátiles y de mayor aplicación en la caracterización e identificación de materiales, análisis de productos farmacéuticos y de síntesis, análisis de contaminantes, ciencia forense, biomedicina, agricultura, alimentos, adhesivos y polímeros entre otros.

##### *Fundamento de la técnica*

Esta técnica permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. La región infrarroja se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). El espectrómetro de IR con transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones señal/ruido (S/N) elevadas [20].

En este trabajo se utilizó en particular una variación de la espectroscopia de IR denominada ATR. El ATR (de inglés *attenuated total reflection*) se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal transmisor y de alto índice de refracción. Éste está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal, la cual se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito. La gran ventaja de esta técnica es que pueden analizarse moléculas ancladas sobre una superficie, mientras que en la técnica IR normal deben prepararse pastillas mezclando KBr con el analito.[21]

El laboratorio cuenta con un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier modelo Varian 660, con una fuente MIR y con el accesorio de ATR (MIRacle ATR, Pike Technologies) con cristal de ZnSe con el cual se puede obtener espectros en la región del infrarrojo entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ .

## 2.2 Otras Técnicas

### 2.2.1 Ángulo de contacto:

La hidrofiliidad de las diferentes superficies fue estudiada mediante la medida del ángulo de contacto utilizando un goniómetro Rame Hart modelo 290, serie U1, disponible en el laboratorio.

#### *Fundamento de la técnica*

Cuando un líquido se esparce sobre una superficie sólida se forma una línea de contacto entre las tres fases denominada línea de mojado. Si el líquido se esparce totalmente el ángulo que se forma entre la superficie del líquido y la superficie sólida,  $\Theta$ , es cero, en cambio, si se forma una gota definida se establece un ángulo de contacto definido [22]. (figura 2.12)



Figura 2.12: Izquierda: esquema de una gota de líquido con un ángulo de contacto  $\Theta$  sobre la superficie. Derecha: esquema representando los ángulos de contacto típicos de una superficie hidrofóbica o hidrofílica.

La técnica se basa en la ecuación de Young (Ec. 2.6), que describe el fenómeno de mojado relacionándolo con las tensiones interfaciales.

$$\gamma_{LG} \cdot \cos\theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL} \quad \text{Ec. 2.6}$$

$\gamma_{LG}$ : energía libre superficial de la interfase líquido-gas;  $\gamma_{SG}$ : energía libre superficial de la interfaz sólido-gas y  $\gamma_{SL}$ : energía libre sup de del sólido-líquido. Si  $\gamma_{SG} > \gamma_{SL}$  entonces  $\cos\theta$  es positivo y el ángulo de contacto es menor a  $90^\circ$ , por lo tanto, la superficie es hidrofílica. En el caso de una superficie hidrofóbica, el  $\cos\theta$  es negativo y  $\gamma_{SG} < \gamma_{SL}$ .

### *Instrumentación*

En la figura 2.13 se muestra una fotografía del equipo utilizado: El equipo consta de una bomba (a) que permite la circulación del líquido de medida mediante una manguera en cuyo extremo se coloca un *tip* cuyo tamaño dependerá del volumen de la gota a descargar. Esta manguera se sujeta a un dispositivo donde se coloca el *tip* mediante un brazo (c) que lo fija cerca de la base porta muestras (b), que puede ser regulada en altura para lograr enfocar la superficie con la cámara (d) durante la medida.

El método consiste en depositar sobre el sustrato a analizar una gota de agua ultrapura y luego determinar mediante el software Dropimage el ángulo de contacto promedio.

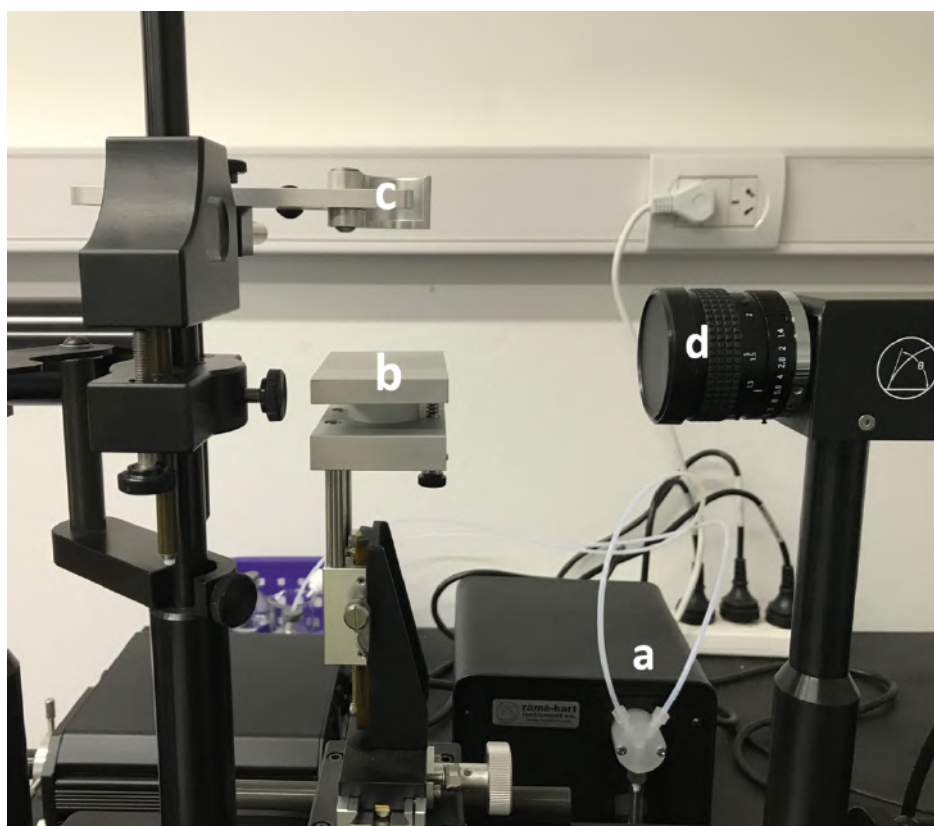


Figura 2.13: Fotografía del equipo de medida de ángulo de contacto utilizado en este trabajo. a) bomba y mangueras por las que circula el líquido, b) base porta muestras donde se coloca la muestra, c) brazo que sujeta el *tip* por donde se vierte la gota durante la medida, y d) cámara.



## 2.2.2 Espectroscopía UV- Visible

La espectroscopía de absorción de luz ultravioleta-visible es muy utilizada en el análisis químico ya que las medidas en el rango de longitud de onda entre el visible y el ultravioleta brindan información cuali y cuantitativa acerca de una gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas.

### *Fundamento de la técnica*

Una sustancia denominada activa en el visible (para longitudes de onda  $\lambda$  entre 380 y 780 nm, aproximadamente) absorbe a ciertas longitudes de onda del espectro visible y transmite la luz a las restantes longitudes de onda, lo que se aprecia como el color de esa sustancia. Por ejemplo, una solución es azul debido a que dentro de la región visible absorbe radiación en el rango de 700-800 nm. En este rango de longitud de onda se encuentra el color rojo del visible, por lo tanto esta sustancia absorbe este color y transmite los colores complementarios que dan origen al color azul de la solución que se observa a simple vista [23]. En la figura 2.14 se muestra el espectro de radiación electromagnética en la región visible.

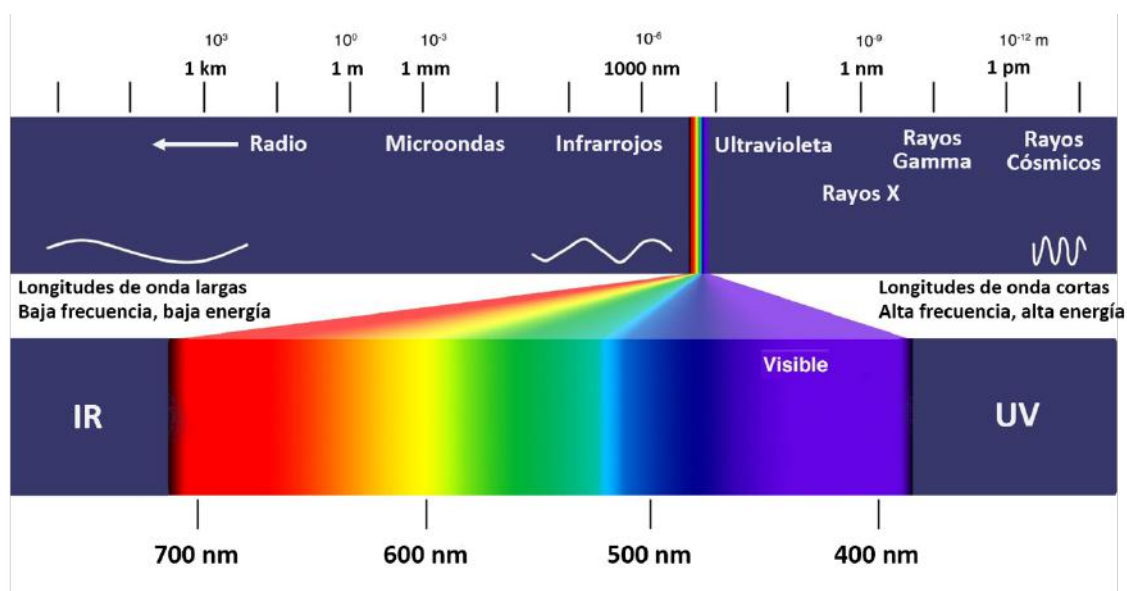


Figura 2.14: espectro de radiación electromagnética

El fundamento de la espectroscopía de UV-vis se basa en la absorción de radiación ultravioleta-visible ( $\lambda$  entre 190 y 800 nm) por una molécula, produciendo la

excitación de un electrón. Esto sucede porque al incidir una radiación de cierta  $\lambda$  sobre una muestra se produce la absorción parcial de la misma, causando una transición en los niveles energéticos de la especie Y (ya sea un átomo, una molécula o un ión) y ésta pasa a un estado excitado ( $Y^*$ ). El resto de la radiación es transmitida. Es posible analizar un estado u otro de la sustancia y relacionarlo con la cantidad de especie activa presente en la muestra.

Las bandas que aparecen en un espectro UV-visible son anchas, ya que se superponen transiciones vibracionales y electrónicas. Por otro lado, la excitación corresponde a los electrones de enlace; entonces, los picos de absorción se pueden correlacionar con los tipos de enlaces presentes. Por esta razón, la espectroscopía de UV-vis es utilizada como técnica de identificación de grupos funcionales de una molécula [24].

Por otro lado, las nanopartículas metálicas presentan espectros de absorción en el UV-visible, debido al fenómeno de resonancia plasmón superficial (SPR) producido por la oscilación colectiva de los electrones en modos vibracionales específicos en la banda de conducción cercana a la superficie de las partículas en respuesta a la luz. Este mismo fenómeno es el responsable del color intenso característico de cada dispersión coloideal por el scattering y la absorción de luz visible. El espectro de absorción en el UV-visible y el valor de  $\lambda_{\text{max}}$  para las nanopartículas metálicas depende la naturaleza del metal, la forma y el tamaño de éstas y de las características del medio de dispersión. Las nanopartículas metálicas tienen propiedades ópticas que son particularmente sensibles al tamaño, forma, concentración, y estado de aglomeración del coloide, ya que se obtienen bandas características que se modifican según lo que le ocurra a las nanopartículas. Esto hace que la espectroscopía UV-visible sea muy utilizada para caracterizar, identificar y estudiar estos nanomateriales [25]–[28].

### *Instrumentación*

Los componentes de un equipo de espectroscopía de UV-Vis son: (1) fuente de radiación; (2) sistema óptico (monocromador, filtros o ventanas, espejos y dispersor o red de difracción); (3) compartimiento para las muestras y (4) detector. En general el material usado para la construcción de la celda, monocromador y las ventanas es el cuarzo, ya que su rango inferior de transmisión alcanza los 190 nm, lo cual es muy útil para el caso de analitos que absorben a longitudes de onda menores a 300 nm. El espectrofotómetro mide la cantidad de luz transmitida (transmitancia T) o la absorbancia

( $A = -\log T$ ) de la muestra presente en una cubeta transparente con un camino óptico conocido  $d$ . En general, la concentración  $C$  de la solución absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia, de acuerdo a la conocida ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot C \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar, característico de cada cromóforo.

Así, esta técnica puede utilizarse cuali y cuantitativamente para analizar muestras, identificando cromóforos y su concentración.

En este trabajo de Tesis se empleó un espectrofotómetro UV-visible Lambda 35 de doble haz de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA).

### **2.2.3 Dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial Z**

La técnica se utiliza para estimar el tamaño de partículas en dispersión y se basa en irradiar con un haz láser a un ángulo determinado ( $173^\circ$ ) la muestra que se encuentra en una cubeta plástica transparente. El equipo analiza la distribución de la velocidad de movimiento browniano de las partículas de una dispersión midiendo las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada. Esto permite aproximar el diámetro de las partículas, considerándolas esféricas, utilizando la ecuación de Stock-Einstein (Ec. 2.8) que relaciona el coeficiente de difusión de las partículas con el radio hidrodinámico [29].

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad \text{Ec. 2.8}$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión,  $R$  es el diámetro de partícula,  $\eta$  es la viscosidad del solvente,  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura del sistema.

Si además se aplica un campo eléctrico determinado sobre la muestra, la velocidad del movimiento de las partículas hacia uno u otro electrodo se relaciona entonces con la carga eléctrica que rodea la superficie de estas (movimiento electroforético), lo que da una idea de la carga superficial de las partículas en la dispersión. En este caso es importante conocer el pH y la fuerza iónica de la dispersión ( $\mu$ ), ya que son factores que alteran este parámetro.

Cuando se trabaja con nanopartículas, esta técnica es muy útil para la caracterización de las mismas, ya que permite obtener un tamaño aproximado de manera rápida y sencilla, y se puede analizar por ejemplo, la estabilidad de las nanopartículas según el pH y la fuerza iónica de la dispersión.

Las medidas de este trabajo se llevaron a cabo utilizando un Zetasizer Nano-ZS de Malvern Instruments, que utiliza un láser de 4-mW He-Ne (633 nm) y un generador de campo eléctrico. Las muestras de AgNPs se midieron a 25°C a un pH=7,3 y  $\mu=0$  ya que no hay presente iones en la dispersión dializada y el solvente utilizado fue agua Milli-Q.

#### **2.2.4 Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-OES)**

La técnica de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-OES) se basa en la radiación emitida cuando un átomo o ion excitado por absorción de energía de una fuente caliente, se relaja a su estado fundamental. La cantidad de energía emitida dependerá de la cantidad de átomos presentes del metal correspondiente, por lo que se utiliza para determinar concentraciones de estas especies en solución. El primer paso, por tanto, es la atomización de la muestra. Para excitar los átomos se utiliza plasma de argón a 10.000 K, constituido por una mezcla gaseosa conductora de argón, electrones y cationes de la muestra a analizar. Para determinar la concentración, esencialmente, se necesita un nebulizador para conseguir un aerosol de partículas y un atomizador que mediante calentamiento (plasma o llama) produce átomos o iones independientes. Así, basta con un sistema de excitación térmico (la propia fuente de atomización) y un detector. Para determinar la concentración de los metales se realizan en primer lugar las curvas de calibración correspondientes a cada metal en el intervalo de concentración comprendido entre 0 y 10 mg L<sup>-1</sup>. Para cada metal se realizan cuatro puntos de calibración. Las disoluciones se preparan a partir de disoluciones patrón certificadas para análisis de emisión atómica de 1000 mg/L en medio ácido nítrico.

En este trabajo se utilizaron los servicios de la planta piloto PLAPiMu perteneciente a la comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), para determinar la cantidad de plata total en los diferentes sustratos modificados, y para cuantificar la liberación de iones plata desde dichas superficies a diferentes tiempos (2h, 24h y 72h; 5 y 15 días). Para esto se tomaron muestras de 12 mL de volumen final y se acidificaron con HNO<sub>3</sub> (65% p/p, Anedra) en un 2% v/v.

#### **2.2.5 Cuantificación de iones Ag<sup>+</sup> con electrodo selectivo de Plata**

Para la cuantificación de iones en solución acuosa se utilizó, también un electrodo selectivo de iones plata/sulfuro HI4115 marca Hanna Instruments (figura 2.16).

### Fundamentación

El mismo funciona como un potenciostato midiendo el cambio en la diferencia de potencial de una membrana selectiva de iones respecto de un electrodo de referencia. Cuando la fuerza iónica de la solución es constante, este cambio se debe a los iones plata presentes en ella. Mediante un voltímetro de la misma marca acoplado al electrodo, el potencia es transformado en concentración siguiendo la ecuación de Nernst.

$$E = E_a + \frac{2RT}{nF} \log A_{ion} \quad \text{Ec.2.9}$$

Donde E es el potencial observado,  $E_a$  es el potencial de referencia, R la constante de los gases, T es a temperatura absoluta, n es la carga del ion, F la constante de Faraday, y  $A_{ion}$  la actividad del ion en la muestra.

### Instrumentación

El electrodo consta de un cilindro central cerámico que contiene en su extremo inferior una membrana sensible a iones, recubierto por un cilindro plástico o cubierta externa. El espacio entre estos cilindros se rellena con una solución de KBr 3M para realizar la medida (figura 2.15). Se debe realizar una curva de calibración con soluciones standard.

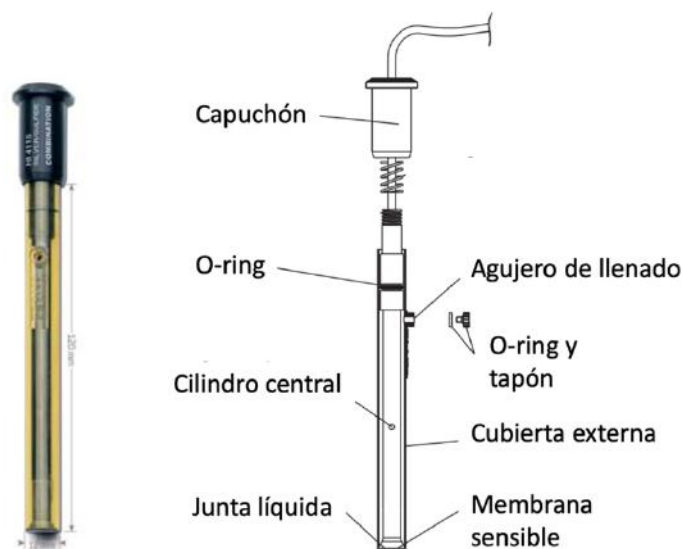


Figura 2.15: foto y esquema del electrodo utilizado

Para realizar las medidas primero se debe calibrar el electrodo con soluciones de  $\text{AgNO}_3$  de concentración conocida. Para esto se utilizó el método de Mohr, que consiste en la titulación por precipitación según la reacción  $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl}$ . Se utilizó una solución de  $\text{AgNO}_3$  para titular 50 mL de una solución  $\text{NaCl}$  0,02M (preparado con  $\text{NaCl}$  p.a seco y agua ultrapura), utilizando  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (Cicarelli) para visualizar el punto final. Luego, se calcularon a partir del volumen empleado (5,8 mL) de  $\text{AgNO}_3$  los moles de  $\text{Ag}^+$  presentes y por ende la concentración real de la solución de  $\text{AgNO}_3$ , que resultó ser 0,00525 M (51,4 ppm). Con esta solución patrón se prepararon otras de 0,5; 2; 5; 10 y 15 ppm que se utilizaron para calibrar el electrodo.

Este electrodo se utilizó para analizar la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  en las siguientes condiciones:

Cuantificación de los iones  $\text{Ag}^+$  liberados a partir de los sustratos modificados: se sumergieron éstos en agua Milli-Q (2 mL para los discos de titanio, Capítulo 6, y 6mL para los tornillos, Capítulo 7) durante un tiempo determinado según el ensayo, luego se trasvasó la solución obtenida a un vaso de precipitados con agitación y se midió la concentración sumergiendo el electrodo en la solución a analizar.

Cuantificación de iones  $\text{Ag}^+$  liberados a diferente pH (4 y 7,3): se utilizó una solución de  $\text{HNO}_3$  de pH 4 y agua ultrapura de pH 7,3. En un volumen de 3 mL de cada solución se sumergieron dos sustratos modificados con AgNPs y se dejaron por 48 h. Luego, se retiraron los sustratos y se midió la concentración de  $\text{Ag}^+$ .

Cuantificación de iones  $\text{Ag}^+$  liberados en solución de Ringer: la solución de Ringer es un fluido biológico simulado utilizado medicinalmente para reponer pérdida de líquidos biológicos, sales, etc. Se utiliza para analizar el comportamiento de dispositivos implantables frente a la corrosión [30], [31]. La composición de la solución se detalla en la Tabla 2. Para realizar la medida, se sumergieron 4 sustratos de titanio modificados en 2 mL de la solución durante 48h, luego se trasvasó el líquido a un vaso de precipitados y se midió la concentración de  $\text{Ag}^+$ .

Tabla 2.2: composición de la solución de Ringer [32]

Sustancia	Cantidad (g/L)
NaCl	7,2
KCl	0,37
CaCl <sub>2</sub>	0,17
NaHCO <sub>3</sub>	Hasta lograr pH 7,3

### 2.2.6 Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)

La técnica de QCM ha demostrado ser muy apropiada para la medición de la adsorción de moléculas cuando se opera en fase líquida [33]. Esto permite diversas aplicaciones tales como monitoreo de la adsorción de proteínas [34], [35], adsorción de vesículas, formación de biofilms bacterianos [36], [37], fijación de polímeros [38], adhesión y propagación de células [39], y la fabricación de biosensores aplicados tanto a la salud como el medio ambiente, entre otras [33].

La parte activa del sistema QCM es un delgado disco de cuarzo con una capa de oro o algún material conductor depositado, que forman un electrodo (figura 2.16). Debido a las propiedades piezoeléctricas del cuarzo, es posible excitar el cristal produciendo una oscilación, a través de la aplicación de un voltaje de corriente alterna. El cristal piezoeléctrico transforma esta señal eléctrica en ondas acústicas, que son atrapadas entre los límites del cristal, reflejándose y resultando en una resonancia del material (figura 2.17). La frecuencia de resonancia del cuarzo es muy estable y puede ser medida con una precisión del orden de los nHz. en general se utilizan cristales de 5Mhz. La adición de una cierta cantidad de masa a la superficie del cuarzo incrementa su espesor. Como resultado, aumenta la longitud de onda de la señal que se forma en el cristal, disminuyendo así la frecuencia de resonancia [40].

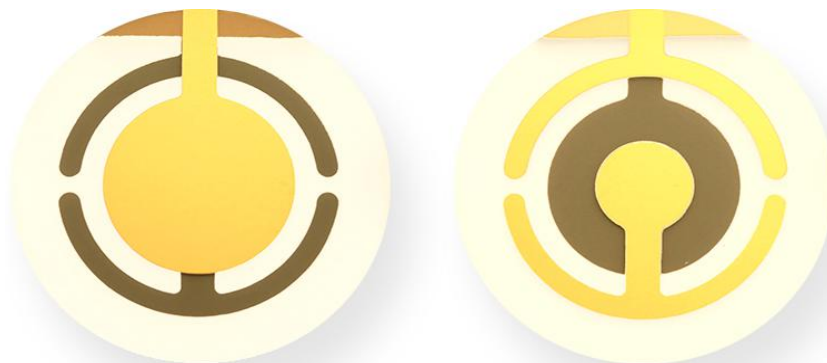


Figura 2.16. Sensores de QCM de oro con una frecuencia de resonancia de 5Hz utilizados en este trabajo. Sobre éstos se depositó por *sputtering* una capa de 50 nm de Ti para obtener la superficie de adhesión deseada.

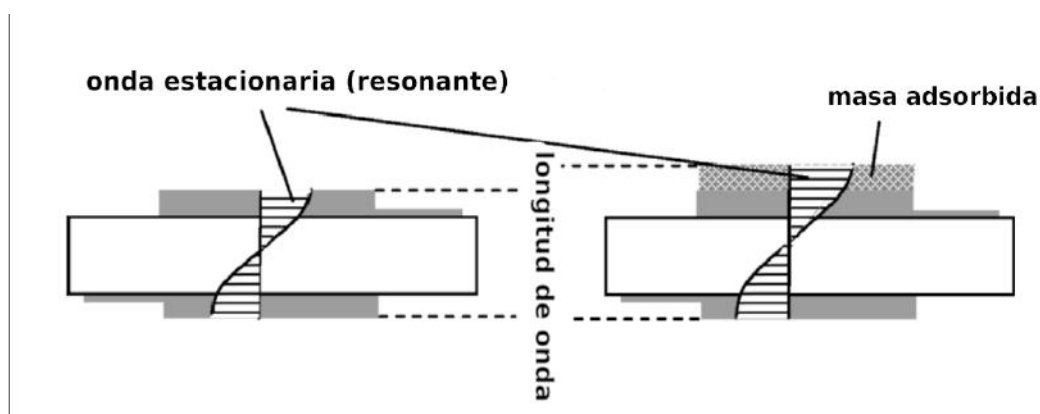


Figura 2.17: efecto del aumento de masa en la frecuencia de oscilación del cristal de cuarzo.

De esta manera, si la película es delgada y rígida, es posible relacionar el cambio de frecuencia  $df$  de resonancia del cristal con una cantidad de masa adsorbida  $\Delta m$  a través de la *ecuación de Sauerbrey* [41]:

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0}{Arv} = -C_f \cdot \Delta m \cdot A^{-1} \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde  $f_0$  es la frecuencia de resonancia fundamental,  $r$  es la densidad del cuarzo,  $A$  es



el área del cristal y  $v$  es la velocidad de las ondas estacionarias, que determinan la constante  $C_f$ , que es un factor de sensibilidad del cristal utilizado, (por ejemplo, para un sensor de 5 MHz AT, el  $C_f = 56.6 \text{ Hz cm}^2/\mu\text{g}$  a temperatura ambiente).

La adsorción de AgNPs se estudió con sensores de cristal de cuarzo QCM de  $1,13 \text{ cm}^2$  de diámetro, con una frecuencia de resonancia fundamental de 5 MHz. Se utilizó un equipo QCM200 de Stanford Research Systems.

Estos sensores de cuarzo están recubiertos en ambos lados con electrodos de Cr/Au de un espesor entre 100-1000 nm de oro. Los cristales fueron subsiguientemente recubiertos con una capa de Titanio puro 99,95% (QX 310 Q-Sense AB, Gothenburg Sweden). Para esto, se utilizó un equipo para sputtering marca Leica y un protocolo de deposición de titanio en condiciones de  $8 \times 10^{-3}$  mbar de presión de Ar y 80 mA de corriente. El equipo permite elegir el espesor deseado. Debido a que la deposición de Ti cambia el valor de la constante  $C_f$ , fue necesario realizar una calibración del electrodo respecto de un electrodo comercial. Esto se realizó mediante la deposición de una monocapa de cisteamina, cuya adsorción sobre Au fue caracterizada por QCM y se sabe que la respuesta de un electrodo comercial es de  $17.5 \text{ ng/cm}^2\cdot\text{Hz}$ . sobre cada electrodo se registró el  $\Delta f$  vs  $t$  de una solución de cisteamina hasta llegar a  $f$  constante (deposición de una monocapa). Luego, se calculó la relación entre el  $C_{f \text{ Au}}$  y el  $C_{f \text{ Ti}}$  obteniendo que  $C_{f \text{ Au}} / C_{f \text{ Ti}} = 6,5$ . Entonces,  $C_{f \text{ Ti}} = 8,7 \text{ Hz} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$

Así, la ecuación de Sauerbrey para el electrodo modificado con titanio es:

$$\Delta f_{\text{Ti}} = - 7,7 \text{ Hz} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \Delta m$$

Los cristales fueron limpiados antes de cada medida con ozono por 45 minutos, luego con etanol absoluto o  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluidos y, finalmente, secados con  $\text{N}_2$  inmediatamente antes de usar.

### 2.2.7 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

El método está basado en el cambio de color del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm (figura 2.18). Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul, según esté o no unido a una proteína,

respectivamente [42]. El cambio de color se produce en un intervalo de 2 minutos y permanece hasta una hora después.

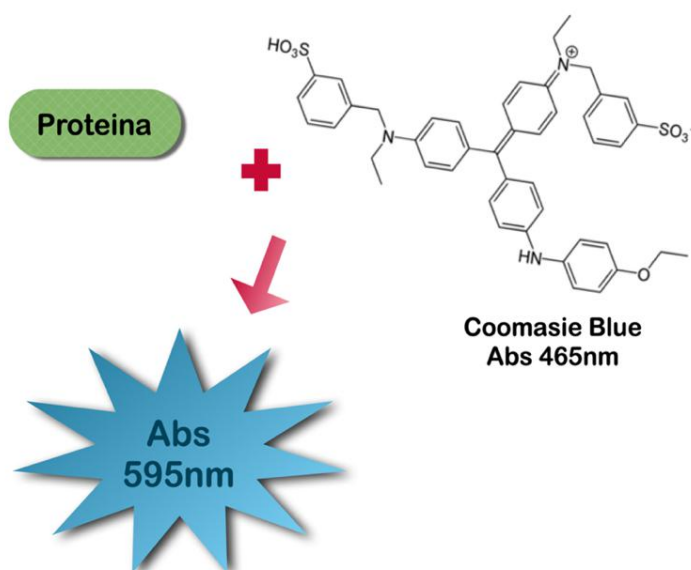


Figura 2.18: Reacción del colorante Azul de Coomasie con los residuos básicos y aromáticos de las proteínas.

La técnica es muy simple: se realiza una curva de calibración (figura 2.19) con soluciones de albúmina de concentraciones conocidas (patrón). En placas multipocillos se colocan 50  $\mu\text{L}$  de muestra diluida o de la solución patrón y se añaden 150  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (Azul de Coomassie en etanol y ácido fosfórico al 85%) listo para usar. Por último, al aparecer coloración azul se lee la absorbancia a 595 nm en un lector de placas.

Finalmente se realizan los cálculos correspondientes de manera de obtener una ecuación de la absorbancia (Y) en función de la concentración de proteína (X) y así determinar la concentración de las muestras analizadas a partir de la absorbancia obtenida para estas.

La técnica presenta algunas interferencias como por ejemplo soluciones reguladoras muy alcalinas, detergentes como SDS, Tritón-X100, glicerol y sacarosa, entre otros.

En este trabajo se utilizó esta técnica para determinar la cantidad de lactoferrina presente en las AgNPs funcionalizadas.

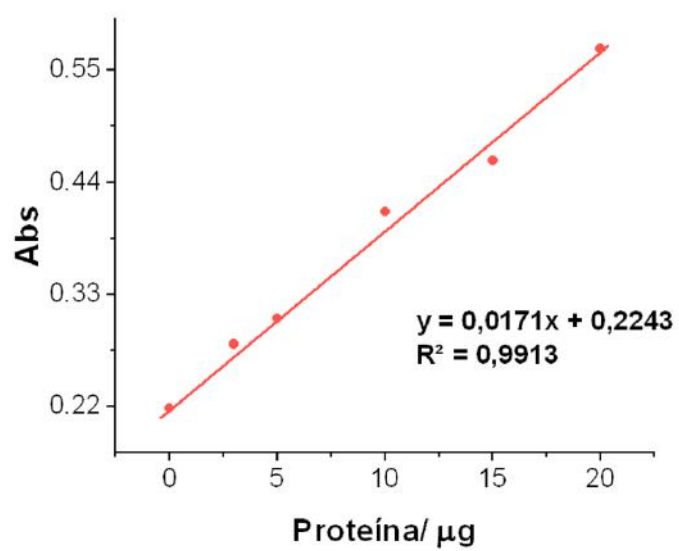


Figura 2.19: Curva de calibración con albúmina bovina en PBS.

## 2.3 Bibliografía

- [1] M. Breitenstein, R. Hölzel, and F. F. Bier, "Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy," *J. Nanobiotechnology*, vol. 8, pp. 1–7, 2010.
- [2] M. Xing, W. Zhong, X. Xu, and D. Thomson, "Adhesion force studies of nanofibers and nanoparticles," *Langmuir*, vol. 26, no. 14, pp. 11809–11814, 2010.
- [3] S. Kasas, V. Gotzos, and M. R. Celio, "Observation of living cells using the atomic force microscope," *Biophys. J.*, vol. 64, no. 2, pp. 539–544, 1993.
- [4] P. Eaton and P. West, *Atomic force microscopy*, 1st ed. Oxford: Oxford University Press, 2010.
- [5] F. Pirani, S. Brizi, L. F. Roncaratti, P. Casavecchia, D. Cappelletti, and F. Vecchiocattivi, "Beyond the Lennard-Jones model: A simple and accurate potential function probed by high resolution scattering data useful for molecular dynamics simulations," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 10, no. 36, pp. 5489–5503, 2008.
- [6] E. Meyer, H. J. Hug, and R. Bennewitz, *Scanning Probe Microscopy: the Lab on a Tip*. Springer Berlin Heidelberg, 2004.
- [7] Mary Cruz Reséndiz González; Jesús Castrellón-Urbe, "Microscopio de Fuerza Atómica," in *Encuentro de Investigación en ingeniería Eléctrica*, 2005, pp. 1–6.
- [8] Dania Olmos; Francisco Javier González Benito, "Microscopía de efecto túnel y Microscopía de Fuerza Atómica." UNiversidad Carlos III de MADrid, Madrid, pp. 1–16, 2008.
- [9] J. Drelich, *Atomic Force Microscopy in Adhesion Studies*. CRC Press, 2005.
- [10] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. a Maksoud, I. M. Elewa, and H. H. Soliman, "Roughness parameters," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 123, no. 1, pp. 133–145, 2002.
- [11] G. J. Lee, K. H. Park, Y. G. Park, and H. K. Park, "A quantitative AFM analysis of nano-scale surface roughness in various orthodontic brackets," *Micron*, vol. 41, no. 7, pp. 775–782, Oct. 2010.
- [12] C. P. Poole and F. J. Owens, "Introduction To Nanotechnology - Poole , Owens.pdf," *Collection Management*, vol. 21, pp. 1–2, 2003.
- [13] C. Guozhong, *Nanostructures and Nanomaterials. Synthesis, properties and applications*. London: Imperial College Press, 2004.
- [14] L. E. Murr, "Introduction to Conventional Transmission Electron Microscopy," *Mater. Charact.*, vol. 51, no. 2–3, p. 201, 2003.
- [15] L. E. P. Buseck, J. Cowley, *High-Resolution Transmission Electron Microscopy and Associated Techniques*. Oxford University Press, 1989.
- [16] "Ultra-high Resolution Scanning Electron Microscope SU9000." [Online]. Available: <https://www.hitachi->

hightech.com/global/science/products/microscopes/electron-microscope/fe-sem/su9000.html.

- [17] T. Sunaoshi, K. Kaji, Y. Orai, C. T. Schamp, and E. Voelkl, "STEM/SEM, Chemical Analysis, Atomic Resolution and Surface Imaging At  $\leq 30$  kV with No Aberration Correction for Nanomaterials on Graphene Support," *Microsc. Microanal.*, vol. 22, no. S3, pp. 604–605, Jul. 2016.
- [18] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, "Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver," *Nanoscale*, vol. 5, no. 16, pp. 7328–7340, Jul. 2013.
- [19] K. Schneider, "Mechanical Properties of Polymers at Surfaces and Interfaces," *Polym. Surfaces Interfaces*, pp. 139–160, 2008.
- [20] ThermoFisher Scientific, "FTIR Basics," *ThermoFisher Scientific*, 2017. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>. [Accessed: 23-May-2018].
- [21] PerkinElmer, "FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)," *PerkinElmer Life and Analytical Sciences*. PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, USA, pp. 1–5, 2005.
- [22] H.-J. Butt, K. Graf, and M. Kappl, "Contact Angle Phenomena and Wetting," *Phys. Chem. Interfaces*, pp. 118–144, 2004.
- [23] T. Owen, *Principios y aplicaciones de espectroscopía Uv-visible*. 2000.
- [24] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de análisis fundamental*. 2008.
- [25] P. K. Khanna, S. Gaikwad, P. V. Adhyapak, N. Singh, and R. Marimuthu, "Synthesis and characterization of copper nanoparticles," *Mater. Lett.*, vol. 61, no. 25, pp. 4711–4714, Oct. 2007.
- [26] K. Okitsu, "UV-VIS spectroscopy for characterization of metal nanoparticles formed from reduction of metal ions during ultrasonic irradiation," in *UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 151–177.
- [27] R. R. Prabhu and M. Abdul Khadar, "Characterization of chemically synthesized CdS nanoparticles," *Pramana - J. Phys.*, vol. 65, no. 5, pp. 801–807, Nov. 2005.
- [28] J. Liao *et al.*, "Linear aggregation of gold nanoparticles in ethanol," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 223, no. 1–3, pp. 177–183, Aug. 2003.
- [29] R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, and S. M. Hussain, "Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique," *Toxicol. Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 239–253, Feb. 2008.

- [30] C. Leinenbach, C. Fleck, and D. Eifler, "The cyclic deformation behaviour and fatigue induced damage of the implant alloy TiAl6Nb7 in simulated physiological media," *Int. J. Fatigue*, vol. 26, no. 8, pp. 857–864, Aug. 2004.
- [31] E. Nouicer, F. Z. Benlahreche, and A. Nouicer, "Spectroscopic Characterization of Titanium Alloy Surface in a Biological Medium," vol. 131, 2017.
- [32] Z. Esen, B. Dikici, O. Duygulu, and A. F. Dericioglu, "Titanium-magnesium based composites: Mechanical properties and in-vitro corrosion response in Ringer's solution," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 573, pp. 119–126, Jun. 2013.
- [33] N. L. Bragazzi, D. Amicizia, D. Panatto, D. Tramalloni, I. Valle, and R. Gasparini, "Quartz-Crystal Microbalance (QCM) for Public Health: An Overview of Its Applications," *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 101, pp. 149–211, Jan. 2015.
- [34] S. Kurosawa, J.-W. Park, H. Aizawa, S.-I. Wakida, H. Tao, and K. Ishihara, "Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 4, pp. 473–481, Oct. 2006.
- [35] E. Yoshida and T. Hayakawa, "Adsorption Analysis of Lactoferrin to Titanium , Stainless Steel , Zirconia , and Polymethyl Methacrylate Using the Quartz Crystal Microbalance Method," vol. 2016, 2016.
- [36] S. Krajewski *et al.*, "Bacterial interactions with proteins and cells relevant to the development of life-threatening endocarditis studied by use of a quartz-crystal microbalance," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 14, pp. 3395–3406, May 2014.
- [37] J. Kreth *et al.*, "Quantitative analyses of *Streptococcus mutans* biofilms with quartz crystal microbalance, microjet impingement and confocal microscopy," *Biofilms*, vol. 1, no. 4, pp. 277–284, Oct. 2004.
- [38] U. Latif, J. Qian, S. Can, and F. L. Dickert, "Biomimetic receptors for bioanalyte detection by quartz crystal microbalances — from molecules to cells," *Sensors (Switzerland)*, vol. 14, no. 12, pp. 23419–23438, Dec. 2014.
- [39] T. Zhou, K. A. Marx, M. Warren, H. Schulze, and S. J. Braunhut, "The Quartz Crystal Microbalance as a Continuous Monitoring Tool for the Study of Endothelial Cell Surface Attachment and Growth," 2000.
- [40] K. Kalantar-Zadeh and B. Fry, *Nanotechnology-enabled sensors*, 1st ed. Springer, 2008.
- [41] G. Sauerbrey, "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung," *Zeitschrift für Phys.*, vol. 155, no. 2, pp. 206–222, Apr. 1959.
- [42] H. García and R. Vázquez, "Cuantificación De Proteínas: Una Revisión," in *Bio Tecnología*, vol. 3, 1998, pp. 78–87.

# **Capítulo 3:**

## **Técnicas de caracterización biológica**





En este capítulo se describen las técnicas utilizadas para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los sistemas estudiados y la interacción de éstos con células eucariotas.

### 3.1. Cultivos bacterianos.

Se emplearon como bacterias representativas de los tipos Gram (+) y Gram (-) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* 215 (aislado clínico), respectivamente. Ambas especies son capaces de formar biofilms sobre diversas superficies y se encuentran dentro de las más frecuentemente aisladas en infecciones asociadas a prótesis [1] [2].

Las características principales de cada microorganismo se describen a continuación:

#### 3.1.1 *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos que poseen un diámetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos. Son bacterias no móviles, no encapsuladas, resistentes a condiciones de alta salinidad y desecación y tienen un metabolismo aerobio facultativo, es decir, que producen ácido a partir de glucosa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas[3]. Son positivos a la tinción de Gram, es decir, que retienen el colorante debido a la alta proporción de peptidoglicano que tiene su pared celular (figura 3.1 [4]).

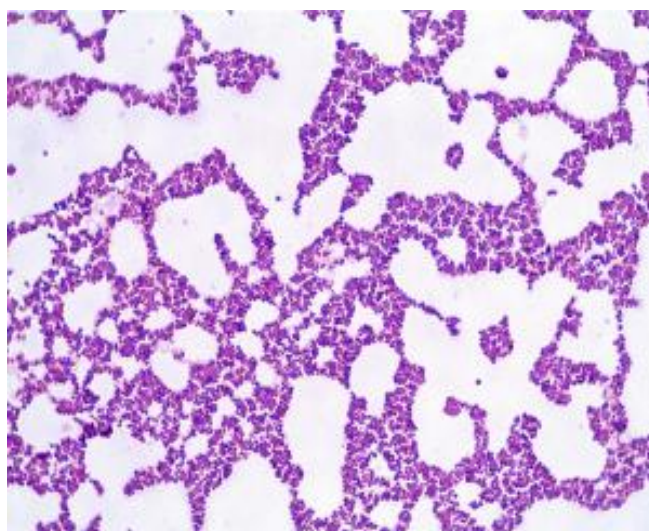


Figura 3.1: imagen de microscopia óptica de *S. aureus* con tinción de Gram

Este género contiene 32 especies, de las cuales aproximadamente la mitad de ellas se localizan en los humanos. Los staphylococcus son comensales y parásitos; de hecho, algunas cepas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, como *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. Por ejemplo, *S. aureus* es un patógeno oportunista que posee una pigmentación amarilla y se asocia con diversas patologías como pústulas, neumonía, meningitis y artritis. La patogénesis de estas infecciones dependen de la capacidad de adhesión del microorganismo para luego formar un biofilm mucoide altamente resistente [5][6]. En particular, *S. epidermidis* y *S. aureus* son los microorganismos más recurrentes en infecciones nosocomiales y poseen varios factores de virulencia como adhesinas y endotoxinas que los hacen difíciles de tratar[7]. Además, en los últimos años se han aislado cepas resistentes a los antibióticos más utilizados como vancomicina y meticilina, aumentando la incidencia de rechazo a los implantes.

En el presente trabajo de Tesis, se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923, proveniente de un cepario propio del Hospital de Pediatría "Profesor Dr. Juan P. Garrahan" de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina y que fue gentilmente cedida por el Dr. Horacio Lopardo.

### **3.1.2 *Pseudomonas***

El género *Pseudomonas* está formado por bacilos Gram (-), es decir, que poseen una delgada pared celular de peptidoglicano y una membrana celular externa, que permite la expulsión del colorante violeta característico de esta tinción (figura 3.2 [8]). Son bacterias de forma alargada de aproximadamente 0,5-0.8 µm por 1,5–3,0 µm. Estos microorganismos generalmente son móviles gracias a que poseen uno o más flagelos polares, son catalasa positivos y no forman esporas [9]. Algunas especies sintetizan una matriz de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biofilms y los protege de la fagocitosis o de otras barreras inmunológicas, aumentando así su patogenicidad [10].

Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente y muestran una alta capacidad de reacción a señales fisicoquímicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes

orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos.

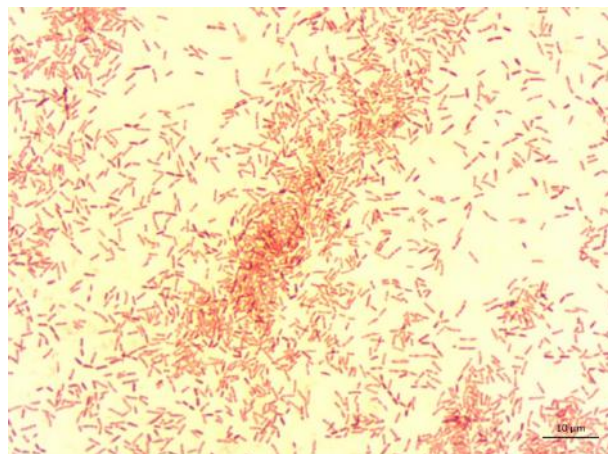


Figura 3.2: imagen de microscopía óptica de *P. aeruginosa* con tinción de Gram.

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es considerada una bacteria modelo para el estudio de la formación de biofilms, ya que es capaz de producir una gran cantidad de EPS, lo cual le permite la adhesión sobre distintos soportes o medios [11]. *P. aeruginosa* es un microorganismo de vida libre, comúnmente encontrado en el suelo y en el agua y puede crecer en condiciones de escasez de nutrientes. En ocasiones puede convertirse en un patógeno oportunista de plantas o de individuos inmunocomprometidos, siendo habitual causante de bacteriemias [12][13]. De hecho, *P. aeruginosa* es el cuarto causante mundial de infecciones nosocomiales según el centro para el control de enfermedades de Estados Unidos (CDC, de sus siglas en inglés), lo que constituye un problema serio en aquellos pacientes hospitalizados que padecen cáncer, fibrosis quística o quemaduras[14]. Estahbanati *et al.* encontraron un 57% de prevalencia de este microorganismo en infecciones en quemados, y el 90% de éstos era resistente a gentamicina, ceftizoxima, carbenicilina y cefalotina [15]. Particularmente, es un microorganismo que posee resistencia natural a antimicrobianos debido a la baja permeabilidad de su membrana celular externa (entre 12 y 100 veces menos que *Escherichia coli*), que constituye una especie de barrera selectiva frente a la entrada de las moléculas de antibióticos [11].

La cepa utilizada en los ensayos realizados en este trabajo es un aislado clínico cedido por el Dr. Alejandro Miñán

### 3.1.3 Conservación de las cepas bacterianas.

La preservación de las cepas bacterianas constituye un paso fundamental para poder llevar a cabo los ensayos. Deben mantenerse sin contaminaciones ni cambios en sus características bioquímicas, fisiológicas y genéticas a lo largo del tiempo. En este caso, se conservó cada cepa a  $-18^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de caldo nutritivo y glicerol (Merck) en proporciones iguales. Para ello, se crecieron los microorganismos en sendas placas con ágar nutritivo (Merck) 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  (condiciones de crecimiento óptimo de estos microorganismos), luego, las colonias formadas se levantaron cuidadosamente con un ansa, se suspendieron cada una de ellas en 1 mL de la mezcla de caldo nutritivo/glicerol estéril e inmediatamente se almacenaron a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.4 medios de cultivo .

Los medios de cultivo utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron:

#### Medios líquidos:

<u>Caldo nutritivo (Merck)</u>
• Peptona de carne: 5g/L
• Extracto de carne: 3 g/L

<u>Medio sintético GMP:</u>
• Manitol: 5 g/L
• Glucosa: 5 g/L
• Glicina: 10 g/L
Buffer fosfato, pH:7,4

### Medios sólidos:

<u>Ágar nutritivo (Merck):</u>
• Peptona de carne: 5 g/L
• Extracto de carne: 3 g/L
• Ágar-ágar: 12 g/L

Los medios líquidos se utilizaron para el crecimiento de los microorganismos con agitación, mientras que los sólidos se utilizaron para el mantenimiento de las cepas y para recuento en placa de bacterias viables.

En particular, el medio mínimo GMP se usó para ensayos antimicrobianos de 24 h que involucraron sustratos con AgNPs para evitar posibles interferencias de los componentes del caldo nutritivo en la liberación de iones. Se comprobó que las bacterias se mantienen viables en este medio durante los tiempos de ensayo [16].

### 3.2 Análisis de bacterias viables

El número de bacterias viables presentes en un determinado volumen puede evidenciarse a través de diferentes técnicas. Las más empleadas son el recuento de células y la determinación de la turbidez de un inóculo en medio líquido, las que permiten cuantificar las bacterias viables como unidades formadoras de colonias (UFC) o como biomasa total de la población microbiana, respectivamente [17].

#### 3.2.1 Determinación de la turbidez:

La determinación de la turbidez permite relacionar la cantidad de biomasa de una población con una magnitud física como la dispersión de la luz, ya que la presencia células bacterianas modifica la absorbancia del medio de cultivo. Así, cuanto mayor sea la cantidad de células en el medio, mayor será la dispersión de la luz y por lo tanto la absorbancia. Estas medidas se efectúan en un espectrofotómetro, (ver Capítulo 2, sección 2.2.1), en el cual la radiación de una determinada longitud de onda incide sobre una cubeta que contiene la suspensión celular (cultivo bacteriano) [18]. El cambio entre

la intensidad de luz incidente en el cultivo ( $I_0$ ) y la transmitida ( $I$ ) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia ( $A$ ) o densidad óptica (D.O.), valor obtenido del log del cociente entre  $I_0$  y la de la luz transmitida por la suspensión,  $A = \log I_0/I$ . A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica.

Se mide entonces la DO o absorbancia a 585 nm ( $DO_{585}$ ). Ésta es una medida indirecta del número de células, por lo que se necesita una curva de calibración que relacione el número de bacterias presentes en el cultivo y la DO. Este método es muy sencillo y rápido pero tiene algunas desventajas: presenta una desviación de la linealidad en la curva a altas concentraciones y el límite de detección es aproximadamente  $10^7$  UFC/mL [19]. Además, a diferencia del recuento de bacterias viables, el método turbidimétrico no permite distinguir bacterias vivas o muertas, sino que se determina la cantidad total de biomasa. A partir de curvas de crecimiento realizadas previamente en el laboratorio con los microorganismos utilizados, se conoce que en las condiciones de trabajo el número de células por mL a  $DO_{585} = 0,5$  es del orden de  $10^8$ , tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus* [20].

### 3.2.2 Recuento en placa:

El método estándar para el recuento en placa consiste en diluir la muestra con buffer PBS o agua bidestilada hasta obtener un número contable de colonias bacterianas, esto es, entre 30 y 300 colonias por placa. Menos de 30 colonias no es considerado un número estadísticamente representativo, y más de 300 dificulta el conteo ya que las colonias crecen unas sobre otras [21].

El primer paso radica en preparar las placas de Petri descartables con agar nutritivo de manera de obtener una capa de entre 4-6 mm de espesor. Esto debe hacerse con anterioridad al ensayo, de forma tal de dejar secar la superficie del agar para que pueda absorber el inóculo bacteriano [22] .

Luego, se realizan diluciones seriadas 1/10 (mínimo 3 diluciones y no más de 7 diluciones) de la muestra conteniendo las bacterias. Así, se obtienen diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  hasta  $10^{-7}$ . Por último, se esparcen con espátula de Digralsky 100  $\mu$ L de cada dilución en una placa de Petri con agar. Se incuban por 24 h a 37°C y luego se cuentan las colonias que se formaron.

El cálculo del número de UFC/mL ( $N$ ) se determina de la siguiente manera (Ec. 3.1):

$$N = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} * 10}{n^{\circ} \text{ dilución}} \quad \text{Ec. 3.1}$$

### 3.2.3 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM).

El método consiste en exponer durante 24h una concentración de microorganismos estandarizada a concentraciones crecientes de un agente antimicrobiano, obtenidas por dilución consecutiva, y luego verificar a partir de qué concentración de antimicrobiano las bacterias son capaces de crecer. Aquella correspondiente a la última dilución que inhibe el crecimiento, se denomina CIM. Este valor es muy útil para comparar la capacidad antimicrobiana de diferentes compuestos. En este trabajo se empleó dicho método para estudiar el posible efecto sinérgico resultante de la funcionalización de AgNPs con Lf.

Se procedió de la forma siguiente:

1. Se preparó un cultivo del microorganismo deseado en caldo nutritivo (CN) por una noche (*overnight*) con agitación (170 rpm) a 37°C
2. Se determinó la DO del cultivo *overnight* y posteriormente se realizó una dilución en medio GMP estéril fresco hasta obtener una DO= 0,5.
3. Se dispusieron 100µL de dicha dilución en cada pocillo de una placa *multiwell* de 96 pocillos.
4. La primera columna de la placa se completó con 100 µL de medio GMP para utilizarse como control de crecimiento.
5. Luego, se colocaron volúmenes de las dispersiones de AgNPs o AgNPs-Lf hasta obtener las concentraciones: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 de AgNPs. De ser necesario se completó el volumen final de 200 L con GMP.
6. Por último, se colocaron en todos los pocillos de la ultima columna de la placa 200 µL de medio GMP. Éstos fueron los controles negativos.
7. Se incubó la placa durante 24 h a 37°C, y pasado ese tiempo se midió la DO<sub>600</sub> en un lector de microplacas. Para la cuantificación de UFC/mL se empleó el método de recuento en placa descrito anteriormente.

### 3.3 Formación de biofilms tempranos sobre sustratos de Ti

Se realizaron ensayos con biofilms tempranos de *P. aeruginosa* y de *S. aureus* sobre los sustratos preparados.

Para el crecimiento de los biofilms se procedió de la siguiente manera:

1. Se preparó un cultivo del microorganismo deseado en CN por una noche (*overnight*) con agitación (170 rpm) a 37°C
2. Se determinó la DO del cultivo *overnight* y posteriormente se realizó una dilución en CN estéril fresco hasta obtener una DO= 0,5.
3. Se colocaron los sustratos a ensayar de forma vertical en sendos *wells* de una placa de 24 *wells* estéril (figura 3.3). Para esto, en cada pocillo se fijó previamente un vidrio de 1x1 cm<sup>2</sup> con cera de ortodoncia de manera que el lado no pulido de los discos de Ti no tenga contacto con el cultivo (ver figura 3.3).
4. Se llenaron los pocillos con 3 mL de la suspensión bacteriana preparada en 2.
5. Se realizó la incubación por 2 h a 37° C y 50% de humedad. En estas condiciones se obtienen biofilms tempranos.
6. Pasado el tiempo de incubación se enjuagaron los sustratos 3 veces con agua destilada estéril para retirar las bacterias débilmente adheridas a la superficie.

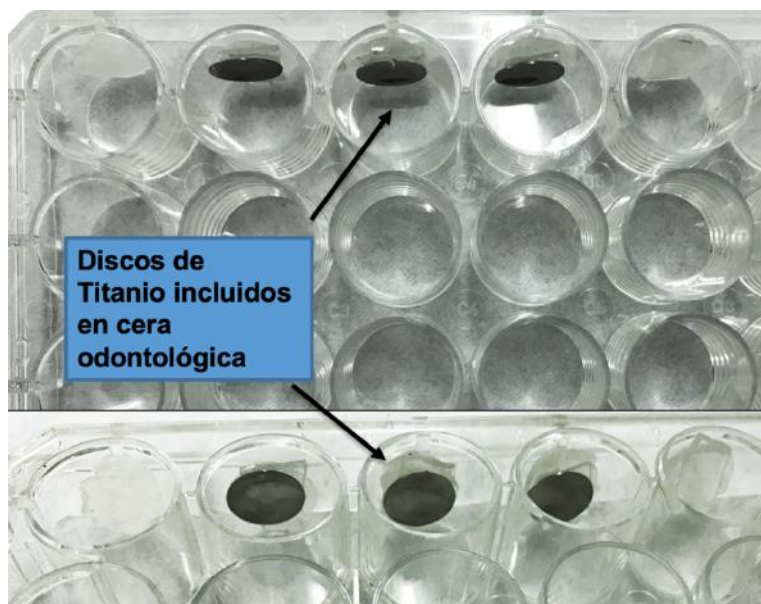


Figura 3.3: esquema de la metodología utilizada para los ensayos antimicrobianos que involucran biofilms tempranos.



### 3.3.1 Recuento en placa de bacterias viables adheridas sobre los sustratos

Para analizar el número de bacterias viables sésiles se utilizó el recuento en placas. Las células adheridas se desprendieron sometiendo a los sustratos colonizados a un baño ultrasónico durante 15 minutos. Estas condiciones fueron puestas a punto previamente en el laboratorio, demostrándose que en estas condiciones no se afecta la viabilidad bacteriana [20]. El tratamiento por ultrasonido es empleado usualmente para cuantificar bacterias adheridas sobre una superficie por dilución en placa [23], [24]. Como ejemplo, unos de los métodos más ampliamente usados para analizar la susceptibilidad de los biofilms a los antibióticos en diagnóstico clínico es el dispositivo de biofilms de Calgary (CBD, por su sigla en inglés), en el que se forman biofilms de cepas patogénicas como *P. aeruginosa* ATCC, *S. aureus* o *E. Coli*, que luego serán expuestos a agentes microbicidas. Las bacterias sésiles que se dispersan empleando baño de ultrasonido y son cuantificadas mediante recuento en placa [25].

Luego de 2 h de incubación de los distintos sustratos en el cultivo bacteriano elegido, se retiraron y fueron lavados cuidadosamente tres veces con agua destilada estéril y colocados en tubos de ensayo conteniendo 1 mL de agua destilada estéril. Luego, los tubos se sometieron a baño de ultrasonido durante 15 minutos a 40 kHz con una potencia de 160 W. Finalmente, se procedió de la manera indicada en la sección 3.2.2 para realizar el recuento en placa (ver figura 3.4).

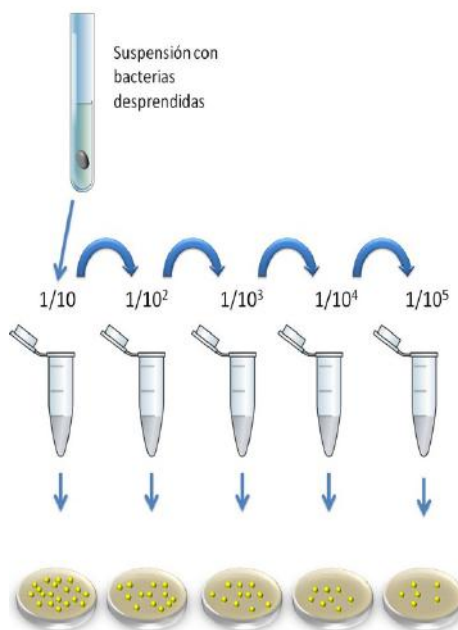


Figura 3.4: Esquema correspondiente al ensayo de recuento en placas de las bacterias desprendidas de los sustratos de titanio.

Se tomaron 100  $\mu$ L de cada tubo y se realizaron diluciones seriadas 1/10. Un volumen de 100  $\mu$ L de cada una se esparcieron en placas conteniendo ágar nutritivo y se incubaron 24 h a 37°C. Por último, se contaron las colonias y, para cada dilución, se calculó el número de UFC/mL mediante la ecuación 3.3. Los ensayos fueron realizados por quintuplicado y de manera independiente. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de un factor con  $p = 0,05$  para obtener resultados estadísticamente significativos.

### **3.3.2 Análisis cuali-cuantitativo del biofilm formado sobre los distintos sustratos**

Como técnica complementaria al recuento en placa se utilizó microscopía de epifluorescencia. Mediante esta técnica se evaluó adhesión y la viabilidad bacteriana y la cantidad de material polimérico extracelular presente en los biofilms de cada especie. A continuación, se detallarán los pasos seguidos en cada caso.

#### **3.3.2.1 Determinación de la viabilidad bacteriana mediante el kit *FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability*.**

Uno de los kits comerciales más ampliamente utilizado para el análisis de bacterias vivas y muertas en un biofilm es el kit *FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability*[26], [27]. El mismo se compone por una mezcla de un colorante verde fluorescente denominado SYTO9® y un colorante rojo fluorescente correspondiente al yoduro de propidio (PI). Ambas sustancias se fijan en el ácido nucleico celular y difieren entre ellos en sus espectros de emisión y excitación y en su capacidad de penetración en las células vivas. Las longitudes de onda de excitación/emisión corresponden a 480/500 nm para el SYTO9® (color verde) y 490/635 nm para el yoduro de propidio (color rojo). Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de penetración de cada uno de ellos en la célula bacteriana. El SYTO9® es capaz de penetrar en todas las células, tanto si tienen o no la membrana dañada, mientras que el PI solamente penetra en las bacterias que poseen la membrana dañada[28]. De esta manera, las células con la membrana intacta (vivas) emiten fluorescencia de color verde y aquellas que tienen la membrana dañada (muertas) emiten fluorescencia de color rojo.

El procedimiento fue realizado conforme al protocolo provisto por el fabricante, ligeramente modificado y puesto a punto para las condiciones de nuestro laboratorio. La técnica consiste en preparar una solución conteniendo 3  $\mu$ L de cada colorante en 1 mL de agua destilada estéril. Esta solución debe ser conservada al resguardo de la luz hasta

ser utilizada. Una vez formados los biofilms sobre cada sustrato, se colocan sobre estos 50 µL de la solución de colorantes y se incuban 15-20 minutos a temperatura ambiente al resguardo de la luz. Luego, se enjuagan los sustratos cuidadosamente con agua destilada estéril, se colocan en un portaobjetos y se tapa con un cubreobjetos para ser observados inmediatamente al microscopio.

Se tomaron 30 imágenes para cada sustrato analizado y se realizaron ensayos por triplicado para realizar los cálculos estadísticos. Utilizando el software ImageJ [29], [30], se estimó la proporción de bacterias muertas de las imágenes obtenidas con el filtro rojo y las bacterias totales en las imágenes obtenidas con el filtro verde (ya que debido a las características de los filtros del microscopio utilizado en 480 nm se excitan ambos colorantes a la vez). El porcentaje de bacterias muertas se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Muerte} = \frac{\text{área teñida de rojo (muertas)}}{\text{Área teñida de verde}} \times 100 \quad \text{Ec. 3.2}$$

### **3.3.2.2 Análisis del material polimérico de la matriz extracelular con el kit *FilmTracer SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain*.**

Un biofilm típico no sólo presenta espesor heterogéneo, sino que además su composición varía a lo largo de una superficie. La matriz está compuesta por sustancias como proteínas y ácidos nucleicos, que varían según el espécimen y las condiciones del medio. Una técnica frecuentemente utilizada para el estudio de la matriz es la tinción con fluoróforos específicos que marcan cada componente, permitiendo así, analizar *in situ* la composición y tener una idea de la cantidad de EPS en el biofilm [31]. En este trabajo se utilizó el kit *FilmTracer SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain* de Invitrogen que tiñe la mayoría de las proteínas de la matriz y tiene longitudes de onda excitación/emisión en 450/610 nm aproximadamente, por lo que las proteínas teñidas se registran de color rojo [32]. Es importante aclarar que algunas de estas proteínas pueden encontrarse sobre de las bacterias, por lo que éstas también se verán de color rojo.

El protocolo utilizado es muy sencillo ya que el colorante es provisto por el fabricante listo para usar. Luego de formar los biofilms de interés sobre cada sustrato, se colocan sobre éstos 150 µL del colorante y se dejan durante 30 minutos al resguardo de la luz. Pasado este tiempo, se remueve delicadamente el exceso de colorante y se

enjuaga con agua destilada estéril. Finalmente, se coloca cada muestra en un portaobjetos, se tapa con un cubreobjetos y se observa al microscopio inmediatamente. Se calculó el área teñida de rojo para cada microorganismo sobre los diferentes sustratos y se compararon de forma cualitativa, correspondiendo una mayor área teñida con una mayor cantidad de EPS.

### **3.4 Células eucariotas**

#### **3.4.1 Cultivos celulares**

Para evaluar la activación del sistema inmune por parte de los sustratos se trabajó con macrófagos Raw 264.7 de rata macho, mantenidos en medio de cultivo DMEM completo[33], descrito en la próxima sección.

Por otro lado, se estudió la adhesión, la proliferación y en el caso del sistema Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf, la diferenciación de células precursoras de osteoblastos de ratón MC3T3-E1 [34], que fueron mantenidas y repicadas en medio DMEM completo descrito anteriormente y en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Estas células son utilizadas como modelo de diferenciación de osteoblastos [35].

#### **3.4.2 Medios de cultivo**

*Medio de crecimiento rico:* Para las líneas celulares se utilizó el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo con Suero Fetal Bovino 10%. Este medio es comúnmente utilizado para cultivo de diferentes células de mamíferos como fibroblastos, neuronas, células de músculo liso, HeLa, osteoblastos, etc. Contiene 4 veces más aminoácidos que el medio mínimo Eagle original y no contiene lípidos, factores de crecimiento o proteínas. Por esta razón requiere ser complementado con suero bovino. Además, tiene un sistema buffer de bicarbonato (3,7 g/L), por lo que requiere una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub> para mantener el pH en valores fisiológicos [36].

Luego de disolver el medio en agua destilada, se agrega bicarbonato para ajustar el pH y se filtra para luego almacenarse en la heladera.

*Medio osteogénico:* Para los ensayos de diferenciación se utilizó medio DMEM completo complementado con 10mM de β-glicerolfosfato y 50mM de ácido mercaptoetanoico [37], [38], ya que estos activan la cascada de genes involucrados en dicho proceso.

### **3.4.3 Tinción con Naranja de Acridina**

En algunos casos se utilizó la tinción con naranja de acridina (N,N,N',N' tetrametilacridina, según nomenclatura de IUPAC), que es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos y se emplea para el estudio de formación de vacuolas lisosomales, autofagia y apoptosis.

Este colorante interactúa con las moléculas de ADN y ARN por intercalación o mediante fuerzas electrostáticas. Al asociarse al ADN, presenta un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm, en el rango del verde. Por otro lado, cuando se intercala con el ARN, la excitación máxima se produce a 460 nm (color azul) y la emisión máxima a 650 nm (color rojo).

Los diferentes sustratos fueron teñidos con 20  $\mu$ L de una solución de 0,05% P/V de naranja de acridina extendida sobre la superficie de los mismos. Luego se mantuvieron en oscuridad por 5 minutos y se observaron por microscopía de epifluorescencia.

Esta tinción se utilizó para el recuento de células adheridas sobre los distintos sustratos preparados en el presente trabajo.

#### **3.4.3.1 Adhesión de macrófagos**

Se sembraron  $15 \times 10^3$  células por cada sustrato colocado en placas de 24 wells y se colocó 1mL de medio líquido. En cada placa se dejaron pocillos sin sustrato en donde se sembraron células a modo de control. Se incubaron 24 h en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Pasado este periodo, se enjuagaron dos veces las superficies delicadamente con PBS y se tiñeron con naranja de acridina para observar en el microscopio de epifluorescencia y contar en número de células adheridas. Finalmente, se determinó el número de células por cm<sup>2</sup> y se realizó el análisis estadístico.

#### **3.4.3.2 Adhesión y proliferación de osteoblastos**

Los osteoblastos son células del hueso encargadas de sintetizar la matriz ósea que está compuesta principalmente por fosfato y calcio. Los osteoblastos mantienen la capacidad para replicarse hasta que son rodeados por la matriz, maduran y desarrollan una menor actividad, transformándose así en osteocitos.

Para todos los ensayos se sembraron células en una proporción de  $37 \times 10^3$  /cm<sup>2</sup> a fin de normalizar el número de células iniciales. Luego de preparar la dilución indicada, se depositó una gota conteniendo todas las células sobre los distintos sustratos

colocados en una placa de 24 wells y se dejó 30 minutos para permitir la adhesión inicial. Para cada placa se dejaron pocillos sin sustrato donde se sembraron células a modo de control. Luego se completó cada pocillo hasta un volumen final de 1 mL con el medio de cultivo y se incubaron 24 h para los ensayos de adhesión o 7 días para los ensayos de proliferación en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. En el caso de experimentos a tiempos largos, se cambió el medio cada 3 días para evitar la muerte celular por acidificación del mismo o por disminución de nutrientes. Antes de realizar el recuento celular se enjuagaron los sustratos con PBS dos veces, y finalmente se tiñeron con naranja de acridina. Las células se contaron en el microscopio de epifluorescencia y se expresaron los resultados como % respecto del número de células contadas en el sustrato control titanio sin modificar (Ec. 3.3).

$$\% \text{ Adhesión} = \frac{N_i}{N_c} \times 100 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde N<sub>i</sub> es el número de células adheridas en el sustrato i, y N<sub>c</sub> corresponde a la cantidad de células adheridas al sustrato de titanio control.

#### 3.4.4 Determinación de viabilidad de osteoblastos adheridos

Se utilizó el kit LIVE/DEAD™ *Cell vitality Assay* de Invitrogen [39]. El mismo consta de dos colorantes: C<sub>12</sub>-resazurina, que es metabolizada a C<sub>12</sub>-resorufina (rojo fluorescente) por las células viables; y SYTOX (verde), el cual es incorporado en los núcleos de células apoptóticas o necróticas.

Se preparó una solución colocando 1 µL de C<sub>12</sub>-resazurina 50µM y 1 µL de SYTOX 1µM cada 100µL de PBS. Luego, se colocaron 50 µL de dicha solución sobre cada sustrato (previamente incubado con osteoblastos durante 24h) y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 minutos, en oscuridad. Finalmente, se colocaron entre porta y cubre objetos para ser observados al microscopio de epifluorescencia alternando los filtros de rojo y verde. Se tomaron 20 imágenes de cada sustrato y se calculó mediante el software ImageJ el % de células vivas en cada sustrato (Ec. 3.4).

$$\% \text{Células Vivas} = \frac{\text{Área teñida de rojo (vivas)}}{\text{Área teñida de verde y rojo}} \times 100 \quad \text{Ec. 3.4}$$

Se preparó un control negativo con células previamente tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% durante 15 minutos.

### **3.4.5 Diferenciación de osteoblastos**

Para el sistema Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf se estudió la capacidad de los sustratos de inducir la diferenciación de osteoblastos en el medio de cultivo adecuado, ya que se ha reportado que la Lf tiene esta propiedad [40].

Durante las primeras horas de cultivo *in vitro* de células osteoblásticas, comienza a producirse la matriz extracelular colagenosa y al cabo de 2 o 3 días se puede detectar la presencia de la enzima fosfatasa alcalina, que participa en la calcificación de la matriz para formar los osteocitos maduros y posteriormente el tejido óseo propiamente dicho [37], [41]. Aproximadamente un 60% del tejido óseo está formado por hidroxiapatita, la cual contiene principalmente calcio y fosfatos. Por esta razón, se utiliza la detección de alguno de estos componentes como indicadores de la diferenciación de células pre-osteoblasticas.

Para la determinación de los distintos marcadores se procedió de igual forma que en los ensayos de adhesión, pero dejando que las células lleguen primero a confluencia sobre los sustratos (3-4 días) con medio DMEM completo, para luego comenzar la diferenciación en medio osteogénico durante 15 días o 21 días en el caso de la mineralización. Durante todo este periodo se recambió el medio cada 3 días para evitar el envejecimiento celular.

#### **3.4.5.1 Determinación de fosfatasa alcalina (FAL)**

Pasado el tiempo indicado (15 días), se retiró el medio de cultivo cuidadosamente, se enjuagaron los sustratos con PBS y se procedió a la determinación cualitativa de la FAL presente en las células sobre cada sustrato. Para esto se utilizó el kit VECTOR® Red Alkaline Phosphatase Substrate [42]. Los controles fueron pocillos sin sustratos y titanio sin modificar. El kit contiene un compuesto que reacciona con la FA y produce un complejo estable y fluorescente color rojizo-naranja que puede ser observado en el microscopio de epifluorescencia. Se colocaron 50µL de la solución de trabajo sobre cada sustrato y se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, las muestras se enjuagaron con PBS o etanol y se observaron al microscopio. Se contaron las células fluorescentes sobre los sustratos modificados y sin modificar. Se calculó el % de área teñida en 20 imágenes de cada una de las muestras.

### 3.4.5.2 Producción de colágeno y mineralización celular como marcadores de diferenciación.

Para la determinación de colágeno, luego de lavar cuidadosamente cada uno de los sustratos con células adheridas, se cubrieron durante 30 min con solución fijadora de Bouin (ácido pícrico, formol y ácido acético en una proporción 15:5:1). Pasado este periodo se lavaron con agua destilada y se agregaron 50  $\mu$ L de reactivo Sirius Red (0,1 %p/v en solución acuosa saturada con ácido pícrico), que se dejaron durante 60 minutos (este colorante aniónico reacciona con los grupos amino de los distintos tipos de colágeno presentes, formando un complejo color rosado [43]). Finalmente, se retiró el exceso del colorante, se lavó con HCl 0,01 N y se extrajo de las células con NaOH 0,1 N. Se leyó la absorbancia a 550 nm (*Abs*) en espectrofotómetro y se determinó la concentración en  $\mu$ g de colágeno /cm<sup>2</sup> utilizando la ley de Lambert Beer, con d=1cm y  $\epsilon$ = 41,88 (Ec. 3.5).

$$[Col] = \frac{Abs.41,88}{\text{área del disco de Ti}} \quad \text{Ec. 3.5}$$

Para el análisis de la mineralización, se utilizó la tinción con Rojo de Alzarina, un colorante que une selectivamente al catión  $Ca^{+2}$  a pH 4,2 formando un precipitado rojo-anaranjado, que se disuelve en agua al alcalinizar el medio [44].

Se incubaron los sustratos con las células durante 21 días en medio osteogénico. Luego de enjuagarse con PBS, se fijaron las células con formalina al 10 % p/v en PBS durante 10 minutos y seguidamente se enjuagaron con agua destilada. Se cubrieron con la solución del colorante (2% p/v en agua, pH=4,2) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se retiró el exceso de colorante, se enjuagó varias veces con agua destilada y se solubilizaron los precipitados con NaOH 0,1 N. Se determinó la concentración en  $\mu$ g de  $Ca^{+2}$  /cm<sup>2</sup> mediante la absorbancia a  $\lambda$ =548 nm (*Abs*), con un  $\epsilon$ = 2,54 (Ec.3.6).

$$[Ca^{+2}] = \frac{Abs.2,54}{\text{área del disco de Ti}} \quad \text{Ec. 3.6}$$



### 3.5 Bibliografía

- [1] S. Ravi, M. Zhu, C. Luey, and S. W. Young, 'Antibiotic resistance in early periprosthetic joint infection', *ANZ J. Surg.*, vol. 86, no. 12, pp. 1014–1018, Dec. 2016.
- [2] W. Zimmerli, A. Trampuz, and P. E. Ochsner, 'Prosthetic-Joint Infections', *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 16, pp. 1645–1654, Oct. 2004.
- [3] E. la Cervantes-García, R. el García-González, and P. M. Salazar-Schettino, 'Características generales del Staphylococcus aureus', *Rev. Latinoam. Patol. Clínica y Med. Lab.*, vol. 61, no. 1, pp. 28–40, 2014.
- [4] Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, 'Staphylococcus aureus | Cepario Unicach'. [Online]. Available: <https://cepariounicach.wordpress.com/2014/09/19/saureus/>. [Accessed: 14-Dec-2019].
- [5] P. Francois *et al.*, 'Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis', *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 35, no. 2, pp. 135–140, 2003.
- [6] F. Fitzpatrick, H. Humphreys, and J. P. O'Gara, 'The genetics of staphylococcal biofilm formation - Will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, no. 12, pp. 967–973, Dec-2005.
- [7] B. Kouidhi, T. Zmantar, H. Hentati, and A. Bakhrouf, 'Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in Staphylococcus aureus associated to dental caries', *Microb. Pathog.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 14–22, 2010.
- [8] Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, 'Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 | Cepario Unicach'. [Online]. Available: <https://cepariounicach.wordpress.com/2014/10/03/pseudomonas-aeruginosa-atcc-27853/>. [Accessed: 14-Dec-2019].
- [9] K. J. (Kenneth J. Ryan, C. G. Ray, and J. C. Sherris, *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. McGraw-Hill, 2004.
- [10] Y. Anzai, Y. Kudo, and H. Oyaizu, 'The phylogeny of the genera Chryseomonas, Flavimonas, and Pseudomonas supports synonymy of these three genera.', *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 47, no. 2, pp. 249–251, Apr. 1997.
- [11] E. B. M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, and R. E. W. Hancock, 'Pseudomonas aeruginosa: All roads lead to resistance', *Trends in Microbiology*, vol. 19, no. 8, pp. 419–426, Aug-2011.
- [12] K. Todar, *The text book of Bacteriology*. 2015.
- [13] M. J. Fine *et al.*, 'Prognosis and Outcomes of Patients With Community-Acquired Pneumonia', *JAMA*, vol. 275, no. 2, p. 134, Jan. 1996.
- [14] R. R. Lovewell, Y. R. Patankar, and B. Berwin, 'Mechanisms of phagocytosis and host clearance of Pseudomonas aeruginosa', *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 306, no. 7, pp. L591–L603, Apr. 2014.
- [15] H. K. Estahbanati, P. P. Kashani, and F. Ghanaatpisheh, 'Frequency of

- Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics', *Burns*, vol. 28, no. 4, pp. 340–348, Jun. 2002.
- [16] F. Ghilini *et al.*, 'Highly Stabilized Nanoparticles on Poly- L-Lysine-Coated Oxidized Metals: A Versatile Platform with Enhanced Antimicrobial Activity', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 28, pp. 23657–23666, Jul. 2018.
  - [17] H. M. Wehr; and J. F. Frank, *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association, 2004.
  - [18] J. M. M. y J. P. M.T. Madigan, *Biología de los Microorganismos*, 10°. Pearson, 2003.
  - [19] P. Dalgaard, T. Ross, L. Kamperman, K. Neumeyer, and T. A. McMeekin, 'Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data', *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 23, no. 3–4, pp. 391–404, Nov. 1994.
  - [20] C. Flores, 'Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida', *Tesis Dr. Univ. Nac. la Plata.*, pp. 1–233, 2014.
  - [21] 'COUNTING BACTERIA', *Lancet*, vol. 261, no. 6773, pp. 1239–1240, 1953.
  - [22] D. J. Reasoner, 'Heterotrophic plate count methodology in the United States', *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 92, no. 3, pp. 307–315, May 2004.
  - [23] M. D. Macia, E. Rojo-Molinero, and A. Oliver, 'Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria', *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 10, pp. 981–990, Oct. 2014.
  - [24] G. Bjerkan, E. Witsø, and K. Bergh, 'Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro.', *Acta Orthop.*, vol. 80, no. 2, pp. 245–50, Apr. 2009.
  - [25] H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret, 'The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms', *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1771–1776, Jun. 1999.
  - [26] R. A. Sturtevant, P. Sharma, L. Pavlovsky, E. J. Stewart, M. J. Solomon, and J. G. Younger, 'Thermal Augmentation of Vancomycin Against Staphylococcal Biofilms', *Shock*, vol. 44, no. 2, pp. 121–127, Aug. 2015.
  - [27] L. Drago, S. Agrappi, M. Bortolin, M. Toscano, C. L. Romanò, and E. De Vecchi, 'How to study biofilms after microbial colonization of materials used in orthopaedic implants', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 3, p. 293, Feb. 2016.
  - [28] M. Syto *et al.*, 'FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit', *Image (Rochester, N.Y.)*, 2009.
  - [29] C. T. Rueden *et al.*, 'ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data', *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, p. 529, Dec. 2017.
  - [30] J. Schindelin *et al.*, 'Fiji: An open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, vol. 9, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 676–682, 28-Jul-2012.
  - [31] S. Schlafer and R. L. Meyer, 'Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix', *Journal of Microbiological Methods*, vol. 138. pp. 50–59, Jul-2017.
  - [32] F. Catalog, 'FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain', *Image*

- (Rochester, N.Y.), pp. 3–5, 2009.
- [33] 'RAW 264.7 ATCC® TIB-71™'. [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/TIB-71.aspx#characteristics>.
  - [34] LGC Standards, 'MC3T3-E1 Subclone 4 ATCC ® CRL-2593™ Mus musculus bone/calv', 2014. [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2593.aspx>.
  - [35] ScienCell, 'Human Calvarial Osteoblasts (HCO)'. pp. 1–3.
  - [36] K. Devrim Seçinti, A. Attar, and E. Seçinti, 'Clinical Trail Using A Silver-Coated Screw-Rod System and One-Year Follow-Up of The First 50 Patients', *Sinir Sist. Cerrahisi Derg.*, vol. 6, pp. 10–21, 2018.
  - [37] L. Malaval, D. Modrowski, A. K. Gupta, and J. E. Aubin, 'Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures', *J. Cell. Physiol.*, vol. 158, no. 3, pp. 555–572, Mar. 1994.
  - [38] S. E. Kim, Y. P. Yun, K. S. Shim, K. Park, S. W. Choi, and D. H. Suh, 'Effect of lactoferrin-impregnated porous poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres on osteogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells (rADSCs)', *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 122, pp. 457–464, 2014.
  - [39] Molecular Probes, 'Live/Dead Cell Vitality Assay Kit (L34951)'. Invitrogen, pp. 19–21, 2004.
  - [40] M. Vandrovцова, T. E. L. Douglas, S. Heinemann, D. Scharnweber, P. Dubruel, and L. Bacakova, 'Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation', *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 2, pp. 525–533, 2015.
  - [41] R. T. Franceschi, B. S. Iyer, and Y. Cui, 'Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells', *J. Bone Miner. Res.*, vol. 9, no. 6, pp. 843–854, Dec. 1994.
  - [42] 'VECTOR Red Alkaline Phosphatase (Red AP) Substrate Kit'. [Online]. Available: <https://vectorlabs.com/vector-red-alkaline-phosphatase-ap-substrate-kit.html>. [Accessed: 22-Jun-2019].
  - [43] S. Bhutda *et al.*, 'Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues', *BIO-PROTOCOL*, vol. 7, no. 21, 2017.
  - [44] C. M. Stanford, P. A. Jacobson, E. D. Eanes, L. A. Lembke, and R. J. Midura, 'Rapidly Forming Apatitic Mineral in an Osteoblastic Cell Line (UMR 10601 BSP)', *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 16, pp. 9420–9428, Apr. 1995.



# **Capítulo 4:**

## **Síntesis y**

### **caracterización de**

#### **nanopartículas de plata.**

##### **Estudios de adsorción sobre**

###### **titanio**

*“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto” Carl Sagan*



## 4.1 Introducción

Los avances en la nanotecnología han facilitado y perfeccionado la utilización de materiales en la nanoescala, ampliando los horizontes de estos conocimientos. Dentro de las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de plata (AgNPs) son cada vez más utilizadas en diversos ámbitos como la medicina y salud, la industria alimenticia y la ingeniería de materiales, debido a sus características físicas y químicas, entre las que se destacan propiedades ópticas, térmicas, alta conductividad eléctrica, y propiedades antimicrobianas [1]–[5]. Estas propiedades, varían según el tamaño y la forma de las nanopartículas, la interacción con agentes estabilizantes y el medio, y, por supuesto, el método de síntesis que se utiliza. Como consecuencia de estas peculiares características, las AgNPs tienen un amplio rango de aplicaciones que incluyen productos de cosmética, productos antimicrobianos y antifúngicos, pinturas, sensores ópticos, recubrimientos, sistemas de diagnóstico, productos para ortopedia, sistemas de distribución de fármacos, drogas anti cancerígenas, etc.[6], [7] Recientemente, estas nanopartículas se han utilizado en la fabricación de textiles, teclados, apósitos antibacterianos y dispositivos médicos [6], [8], [9].

En cuanto a la síntesis de estos nanomateriales, las técnicas empleadas pueden dividirse en dos grupos principales: las metodologías *top-down* y *bottom-up*. *Top-down* (de arriba hacia abajo) se refiere a los métodos en los que se comienza con una gran cantidad de material y se lo reduce para obtener objetos más pequeños. Esta aproximación generalmente incluye varios pasos direccionados, transformando objetos grandes cavando, gastando, moliendo, cortando para reducir su tamaño. Por el contrario, las técnicas *bottom-up* (de abajo hacia arriba) utilizan grupos de átomos o moléculas unidos mediante enlaces químicos y/o fuerzas de interacción físicas como bloques de construcción para construir partículas más grandes [10]. Esta última aproximación es la más aplicada por su rapidez, sencillez y calidad de las nanoestructuras obtenidas. Algunos ejemplos de técnicas *bottom-up* son la reducción de una sal con un agente reductor en fase acuosa[11]–[13] u orgánica [14], [15], mediante métodos electroquímicos[16]–[18], o bien empleando procesos metabólicos celulares (conocidos como química verde) [19], [20], entre otros.

A grandes rasgos, la síntesis de nanopartículas por el método de reducción de sales involucra tres pasos: nucleación, crecimiento y estabilización (figura 4.1). La nucleación se inicia con la reducción de una sal metálica mediante un reductor adecuado para obtener átomos de metal con un estado de oxidación igual a cero. Los átomos

metálicos pueden colisionar con iones metálicos o aglomerados de átomos y de esta manera formar un núcleo metálico denominado *semilla*. Si los núcleos se forman uniformemente en esta fase, se obtendrán partículas de tamaño regular y monodispersas. Contrariamente, (y como normalmente ocurre en fase líquida), si se obtienen núcleos heterogéneos se desarrollan partículas más irregulares [21]. La segunda etapa constituye el crecimiento de estas semillas, a través de la difusión y la deposición de los iones metálicos o átomos metálicos presentes en la solución sobre la superficie de dichos núcleos [22]. En este paso, los factores más importantes son el gradiente de concentración y la temperatura. Por último, la estabilidad de las dispersiones coloidales depende de la presencia de un agente estabilizante, que recubre la superficie de las nanopartículas formadas y evita su aglomeración [23]. Estos agentes pueden ser de distinto tipo (iones, moléculas orgánicas) que actúan o bien electrostáticamente favoreciendo la repulsión entre las partículas, o bien estéricamente como las moléculas orgánicas que actúan como un “escudo” protector en la superficie de las nanopartículas.

En conclusión, los factores cruciales a tener en cuenta para la síntesis de nanopartículas en solución porque determinan su tamaño y su forma, son: la temperatura, la concentración del agente estabilizante y del agente reductor, el pH y la fuerza iónica [21], [24].

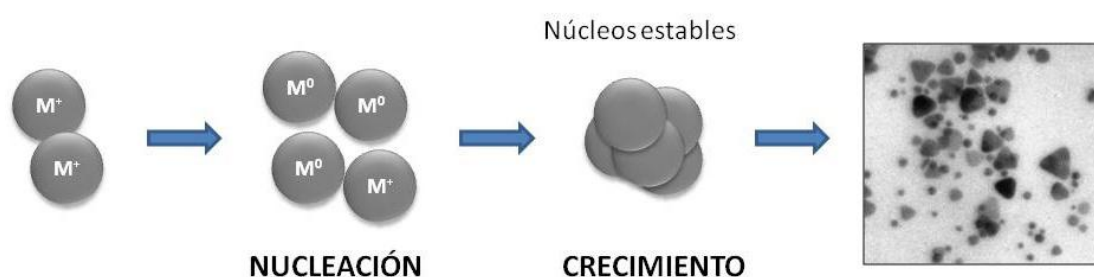


Figura 4.1: Esquema de la formación de nanopartículas metálicas en solución

Entre los factores mencionados arriba, el agente estabilizante que recubre las nanopartículas cumple un rol clave para su anclaje sobre superficies. En particular, las AgNPs citratadas se adsorben espontáneamente sobre Ti debido a las interacciones entre los grupos carboxilo del citrato y el óxido nativo de la superficie del metal [25]. La



afinidad de los ácidos carboxílicos por las superficies de óxido y eventualmente la influencia interacciones del tipo de van der Waals, mantienen a las nanopartículas ancladas sobre la superficie. Dobson *et al.* [26] mostraron mediante espectroscopía infrarroja que diferentes ácidos carboxílicos pueden adsorberse sobre la superficie de  $\text{TiO}_2$ , encontrando, además, que la presencia de un segundo grupo carboxilato permite la formación de estructuras más estables sobre la superficie. Asimismo, Ojamäe *et al.* [27] demostraron que diferentes ácidos carboxílicos, incluido el ácido cítrico, se unen fuertemente a la superficie de  $\text{TiO}_2$  a través de una estructura coordinada tipo puente, donde los dos oxígenos del ácido carboxílico desprotonado se unen a dos iones titanio de la superficie, mientras que Weisz *et al.* [28] propusieron que los ácidos carboxílicos forman complejos sobre superficies de titanio oxidado.

En este capítulo se describen la síntesis y caracterización de AgNPs de distintos tamaños y su utilización en la funcionalización de superficies de titanio.

## 4.2 Método de síntesis de AgNPs de diferentes tamaños.

En el presente trabajo se optimizó la ruta de síntesis previamente reportada por Frank y colaboradores [29]. El método se basa en la reducción de  $\text{Ag}^+$  del  $\text{AgNO}_3$  mediante la utilización de  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor. La síntesis es muy sencilla y rápida y se lleva a cabo en condiciones de exceso de reductor. Como regulador del tamaño de partícula se emplea  $\text{KBr}$  en concentraciones variantes, obteniendo nanopartículas de mayor tamaño a mayores concentraciones de este reactivo. Los reactivos se agregan en solución acuosa, cuyos volúmenes y concentraciones se muestran en la Tabla 4.1.

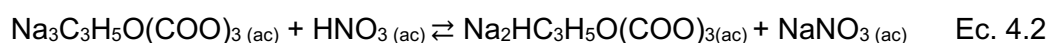
La reacción que tiene lugar es la siguiente [29]:



Tabla 4.1: Soluciones utilizadas para la preparación de 11mL de dispersión de AgNPs

Sustancia	$\text{AgNO}_3$	$\text{NaBH}_4$	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{KBr}$
<b>Concentración (M)</b>	$3.75 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$	$1.25 \times 10^{-2}$	$5.0 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3}$
<b>Volumen (mL)</b>	5	2.5	2	1.5	0 $\mu\text{L}$ ó 20 $\mu\text{L}$

La síntesis se llevó a cabo agregando las soluciones en el siguiente orden: nitrato de plata, citrato de sodio, agua oxigenada, bromuro de potasio (en caso de ser requerido) y borohidruro de sodio en un frasco color caramelo con agitación magnética. El borohidruro se agrega al final ya que es el agente reductor empleado y el disparador de la reacción. A medida que los iones  $\text{Ag}^+$  son reducidos, los átomos de  $\text{Ag}^0$  comienzan a agruparse formando las nanopartículas estabilizadas por el recubrimiento (*capping*) de iones citrato. Al cabo de entre 3 y 5 minutos se obtiene una dispersión de AgNPs estable. El citrato de sodio, además, cumple la función de buffer al reaccionar con el  $\text{HNO}_3$  producido, manteniendo el pH neutro o ligeramente básico (Ec. 4.2 [29]).



Si la concentración de citrato de sodio es muy baja, se obtienen agregados de AgNPs [21]. La adición de peróxido de hidrógeno permite modelar la forma de las nanopartículas, ya que este oxidante actúa sobre las nanopartículas menos estables que recién se forman y se establece un equilibrio entre la reducción de  $\text{Ag}^+$  por el borohidruro y la oxidación por peróxido. El peróxido reacciona con aquellas nanopartículas de rápido crecimiento, asegurando que las menos reactivas sean las que sobrevivan creciendo a expensas de aquellas más reactivas [30]. En ausencia de este reactivo, se produce una reacción desordenada que lleva a la obtención de una dispersión amarilla de AgNPs de forma cuasi esférica con una gran cantidad de defectos estructurales [29].

La característica más importante de esta síntesis es que utiliza KBr como regulador del tamaño de partícula. El  $\text{Br}^-$  se une muy fuertemente a la superficie de las nanopartículas (que tienen algo de  $\text{Ag}^+$ ), formando AgBr y por lo tanto limitando el crecimiento de los núcleos. Este proceso es factible debido al bajo  $K_{\text{ps}}$  del AgBr ( $5.4 \times 10^{-13}$ ). De esta forma, variando las cantidades de KBr añadido a la mezcla de reacción se pueden obtener AgNPs de diferentes tamaños, cuyas dispersiones presentan colores distintos, de acuerdo a la longitud de onda de la banda de resonancia de plasmones superficiales (figura 4.2). Si se añaden 40  $\mu\text{L}$  de KBr se obtienen AgNPs aproximadamente esféricas, polidispersas, de 10-30 nm y un máximo de absorción en alrededor de 400nm, mientras que, por ejemplo, con 25  $\mu\text{L}$  se obtienen tamaños intermedios de 31-39 nm. A medida que disminuye la cantidad de KBr añadido, los máximos de absorción se corren hacia el rojo. Si no se agrega KBr a la mezcla de reacción, se obtienen AgNPs con el máximo tamaño posible para este método, con una distribución polidispersa de tamaños, que incluye nanopartículas tanto esféricas como

con forma de prismas triangulares, siendo éstas más estables que las nanopartículas esféricas [31]. En este último caso, el máximo de absorción se encuentra alrededor de los 750 nm.

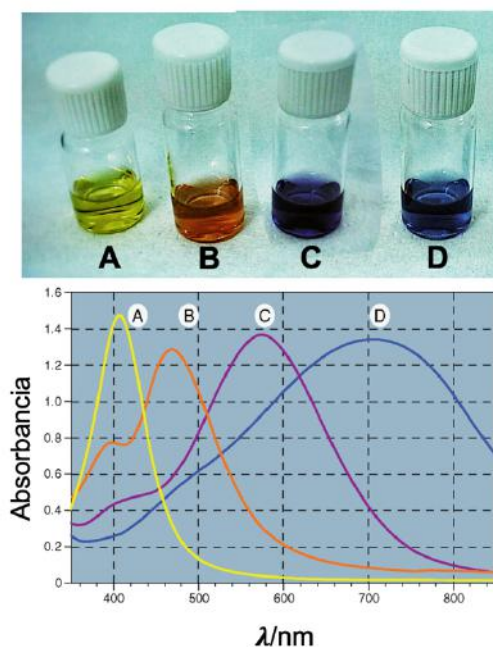


Figura 4.2: Arriba: fotografía de las diferentes dispersiones de AgNPs obtenidas mediante la síntesis de Frank colaboradores. Abajo: espectros UV-vis correspondientes extraídos de lo reportado por Frank *et al.*

En este trabajo se eligió emplear los extremos de los tamaños posibles de AgNPs, y se obtuvieron dispersiones de color amarillo para las más pequeñas y azul para las de mayor tamaño, por lo que se mencionaran a partir de aquí como nanopartículas amarillas y nanopartículas azules.

Luego de la síntesis, se procedió a realizar una purificación mediante diálisis para eliminar los restos de reactivos y evitar el envejecimiento de las AgNPs. La diálisis se llevó a cabo en una membrana de celulosa con un tamaño de poro de 14000 Da provista por Sigma Aldrich. Para esto, primero se activó la membrana en una solución caliente de  $\text{NaHCO}_3$  (1,57% m/v) y EDTA ( $3,66 \times 10^{-3}$  % m/v) durante 20 minutos. Luego, se enjuagó repetidamente con agua bidestilada, se colocó el volumen deseado de dispersión de AgNPs y se sellaron los extremos con broches especiales para diálisis.

Estas bolsas se colocaron en un vaso de precipitados con 1 L de agua bidestilada y se dejaron con agitación leve durante 2 hs. Al cabo de este tiempo se cambió el agua y se dejaron 2 hs más. Finalmente, se retiró la dispersión de AgNPs y se envasó en frascos de vidrio color caramelo debidamente rotulados para ser almacenados en heladera.

El pH de las dispersiones luego de 3 hs de diálisis resultó 7.02 para las amarillas y 7.34 para las azules. Asimismo, se determinó la concentración de plata total para cada dispersión mediante ICP-OES. Para esto, 1 mL de cada dispersión de AgNPs se trató con 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $5 \times 10^{-2}$  M (para oxidar las nanopartículas a  $\text{Ag}^+$ ) y 10 mL de agua bidestilada; posteriormente se acidificaron las soluciones con  $\text{HNO}_3$  65% p/p hasta alcanzar una concentración de ácido del 2%. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 4.2: concentración de plata total para cada dispersión de AgNPs

Dispersión de AgNPs	Amarillas	Azules
Ag ( $\mu\text{g/mL}$ )	$15,4 \pm 0,5$	$14,0 \pm 1,0$

Las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron mediante DLS, potencial Z, espectroscopía UV-Visible, AFM y TEM.

La morfología y tamaño de las nanopartículas se caracterizaron mediante TEM, utilizando un equipo Jeol JEM 2100 TEM. Estas medidas se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Alberto Hernández Creus y del Servicio general de Apoyo a la Investigación (SEGAI) en la Universidad de La Laguna, Tenerife, España. La distribución de tamaños se determinó con el software ImageJ a partir de las imágenes TEM obtenidas (figura 4.3). Los resultados muestran un tamaño de 12 nm de diámetro aproximadamente para las AgNPs amarillas y dos poblaciones para las AgNPs azules: unas más pequeñas de entre 12-15 nm de diámetro y otras más grandes de 40 nm de lateral. A partir de imágenes de AFM de AgNPs adsorbidas sobre sustratos de titanio modificados con poli-L-lisina (ver Capítulo 6), se pudo inferir la altura de las nanopartículas en ambas dispersiones, arrojando un valor de  $11 \pm 2$  nm para las AgNPs amarillas, y, en el caso de AgNPs azules,  $7 \pm 1$  nm para la población más pequeña y

$8.3 \pm 0.8$  nm para las más grandes. De estos resultados, se puede deducir que las AgNPs amarillas tienen una forma aproximadamente esférica, mientras que las azules consisten en nanodiscos (población de menor tamaño) y nanoprismas (población de mayor tamaño).

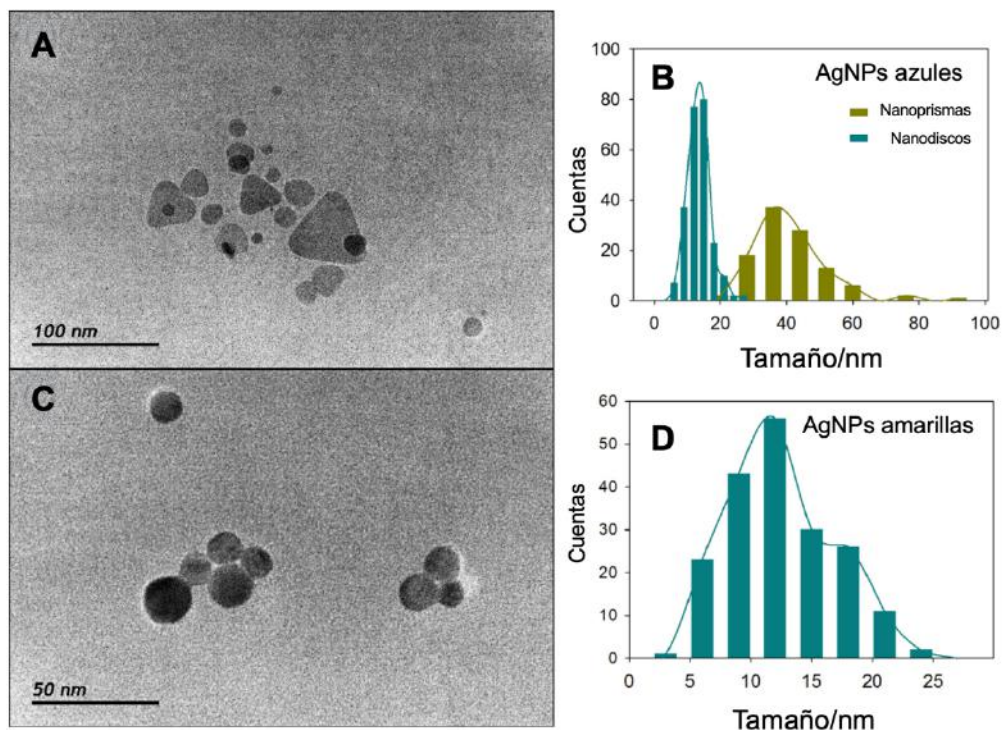


Figura 4.3: Imágenes TEM de: (a) AgNPs azules y (c) AgNPs amarillas. (b) y (d) muestran la distribución de tamaños en las dispersiones azul y amarilla, respectivamente.

El análisis de tamaño por DLS arrojó resultados similares, obteniéndose un radio hidrodinámico (HDD) de  $15 \pm 4$  nm para las AgNPs amarillas y  $43 \pm 26$  nm para las AgNPs azules (figura 4.4). El modelo utilizado para calcular el HDD por este método se basa en la aproximación de Rayleigh, donde la intensidad de la luz dispersada es proporcional al radio elevado a la sexta potencia,  $r^6$ , para partículas pequeñas, según la Ec. 4.3 [32] que describe la distribución de intensidades (para las partículas de tamaño  $a$ ) para una dispersión conteniendo  $N_a$  y  $N_b$  partículas de radio  $a$  y  $b$ , respectivamente. De esta ecuación se deduce que en muestras polidispersas aquellas de mayor tamaño van a contribuir mayoritariamente al cálculo del HDD a partir del % de Intensidad de luz dispersada (%I en Ec. 4.3) [32].

$$\%I = \frac{a^6 N_a \cdot 100}{N_a a^6 + N_b b^6} \quad \text{Ec. 4.3}$$

En el caso de las AgNPs azules, la polidispersidad se manifiesta por la gran desviación estándar que presenta la medida (26 nm).

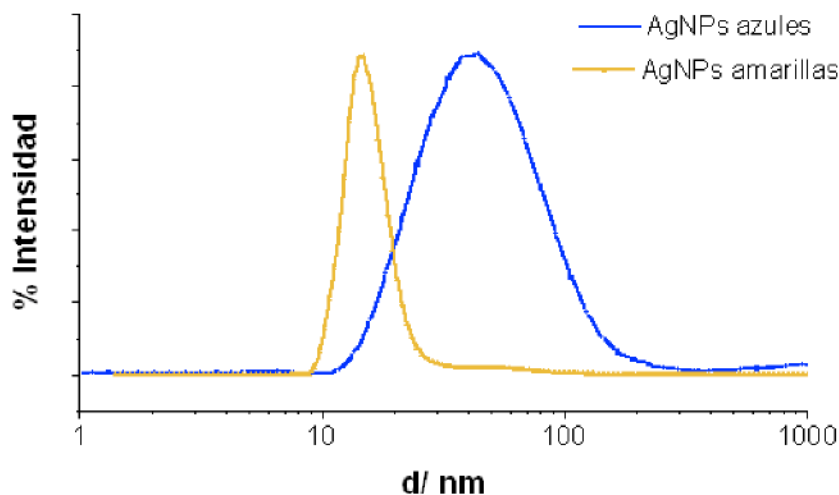


Figura 4.4: Curvas obtenidas para el radio hidrodinámico de las AgNPs amarilla y azules mediante la técnica de DLS.

Como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.2, el espectro de absorción en el UV-visible y el valor de  $\lambda_{\text{max}}$  para las nanopartículas metálicas depende la naturaleza del metal, la forma y el tamaño de éstas y de las características del medio de dispersión. Además, el espectro UV-Visible es afectado por las interacciones entre partículas. Los espectros UV-visible reflejan la forma de las AgNPs, ya que dependiendo de ésta, los máximos de las bandas de absorción se corren hacia el rojo o el azul o aparecen nuevas bandas [33]. Esta técnica es comúnmente utilizada, además, para estudiar la estabilidad/agregación de las AgNPs [34].

Otro parámetro de utilidad en el análisis de los espectros es el ancho total a la mitad del máximo (FWHM, de sus siglas en inglés). Éste se determina como se describe en la figura 4.5, y se relaciona con la polidispersidad de la muestra [35]. Para AgNPs como las amarillas obtenidas en esta síntesis, se observa una banda simétrica y un FWHM chico. Al contrario, cuando hay polidispersidad la banda del espectro tiene una forma asimétrica y el fwhm aumenta [36].

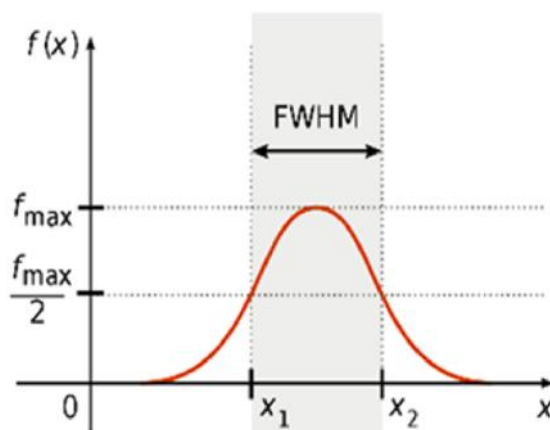


Figura 4.5: ejemplo de determinación del FWHM en un espectro.

Los espectros UV-visible de cada dispersión se muestran en la figura 4.6. Para las AgNPs amarillas se observa una única banda estrecha con máximo en 407 nm, consistente con una distribución monodispersa de partículas y con el tamaño encontrado por DLS y TEM [37]. Por otro lado, el espectro correspondiente a las AgNPs azules muestra tres bandas localizadas en 325 nm, 413 nm, y 740 nm. Estas bandas son típicas de nanopartículas con forma prismática [38], [39], y se asignan a la resonancia del plasmón del cuadrupolo fuera del plano, el cuadrupolo en el plano y el dipolo dentro del plano, respectivamente [40], [41].

Adicionalmente, el ancho de la banda principal cuyo máximo se encuentra entre 600 nm y 740 nm dependiendo de la síntesis, refleja la contribución de nanopartículas de diferentes formas y tamaños a la SPR, en concordancia con lo observado por TEM (figura 4.2 a).

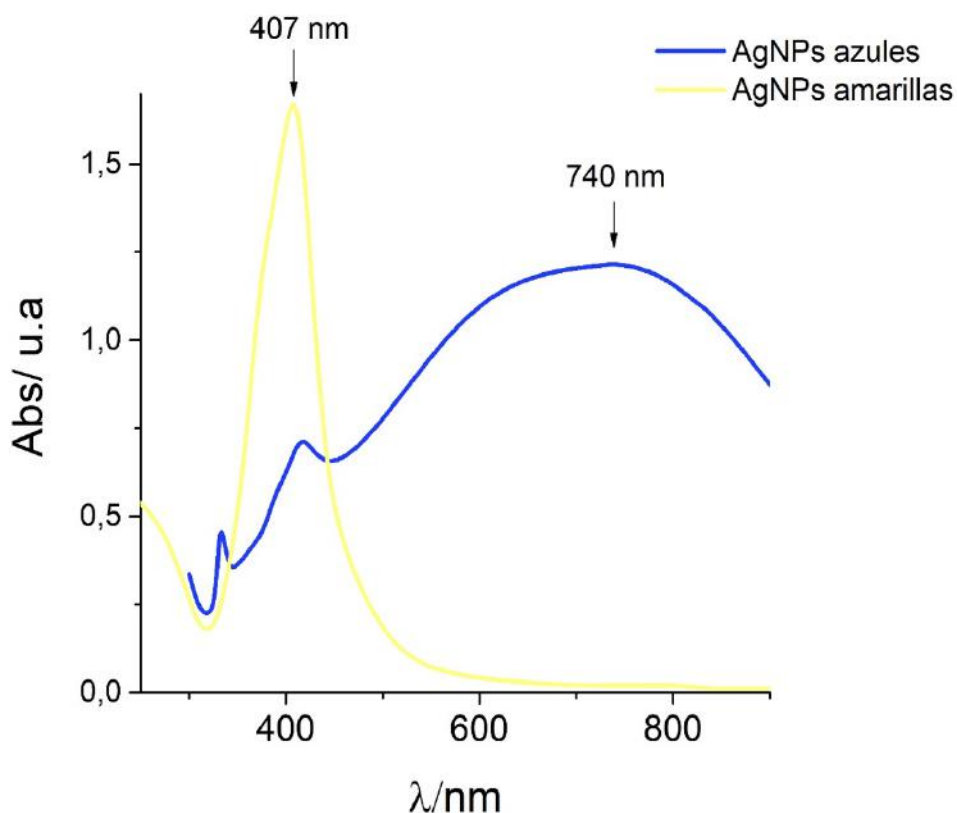


Figura 4.6: Espectros UV-Visible de las dispersiones de AgNPs sintetizadas y dializadas.

La medición del potencial Z ( $\zeta$ ) realizado en el laboratorio a partir de una dilución 1:2 de cada dispersión de AgNPs arrojó valores de  $-29 \pm 0.7$  mV para las amarillas y de  $-28 \pm 0.8$  mV para las azules, confirmando que a pH neutro tienen una carga superficial negativa, consistente con la carga negativa proporcionada por los iones citrato que recubren las AgNPs. El  $\zeta$  de un coloide está relacionado con su estabilidad, aceptándose que valores entre  $\pm 0$ -10 mV corresponden a dispersiones inestables;  $\pm 10$ -20 mV a dispersiones relativamente estables;  $\pm 20$ -30 mV a aquellas moderadamente estables y  $>30$  mV a altamente estables[42]. Por otro lado, según la teoría Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO), la más aceptada sobre coloides, la estabilidad de



la dispersión depende de la suma de las fuerzas atractivas de Van der Waals y las repulsivas electrostáticas. El potencial zeta proporciona información acerca de las fuerzas electrostáticas repulsivas y no tiene en cuenta las fuerzas atractivas; cuando las fuerzas atractivas son débiles, pequeñas repulsiones electrostáticas, reflejadas por un potencial zeta pequeño, pueden ser suficientes para asegurar la estabilidad de la dispersión coloidal [42].

Un punto importante a destacar es que las AgNPs preparadas mediante este procedimiento mostraron ser muy estables, pudiéndose almacenar por más de 3 meses. La figura 4.7 muestra los espectros UV-visible de una dispersión de AgNPs azules recién preparada y otra guardada por más de 3 meses. Se observa para esta última un pequeño corrimiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda más grandes, probablemente debido a una leve aglomeración de AgNPs.

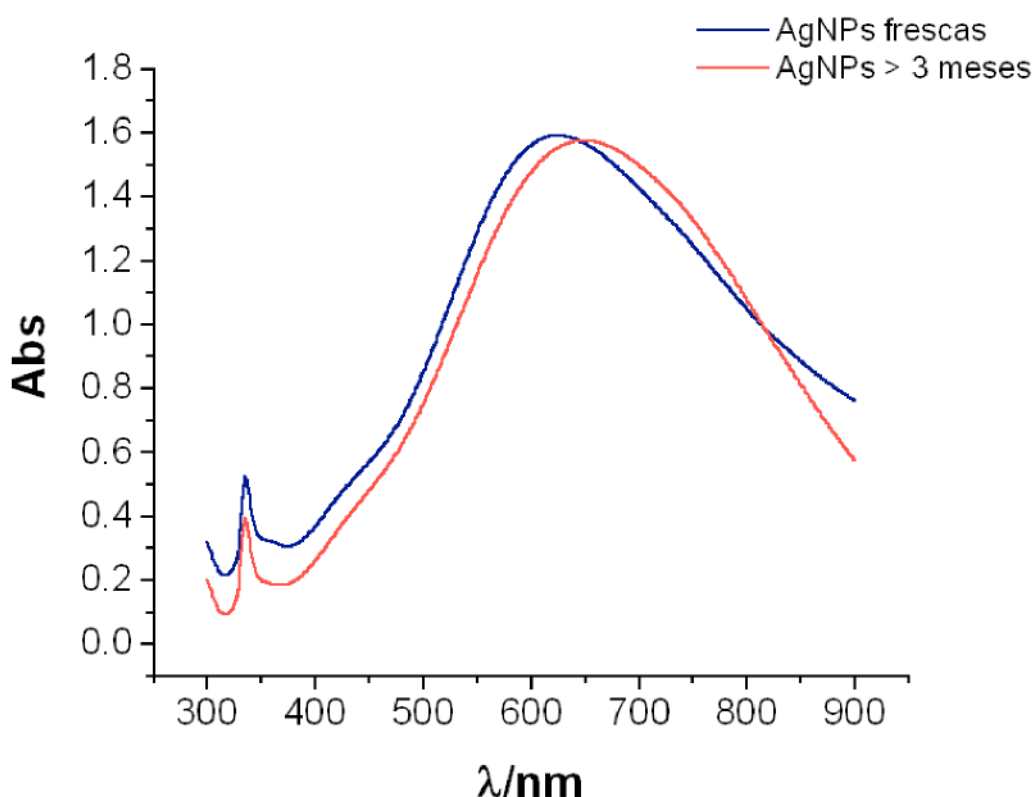


Figura 4.7: Espectros UV-visible de dispersiones de AgNPs recién sintetizadas y luego de 3 meses de almacenamiento en heladera.

### 4.3 Estabilidad de las AgNPs a diferentes pH.

Cuando un tejido se encuentra infectado, normalmente se acumulan localmente productos ácidos, como por ejemplo el ácido láctico, que baja el pH del tejido entre 0.5 y 1 unidad, causando lo que se conoce como acidosis [43]. Esta modificación en el medio puede alterar la farmacocinética y farmacodinamia de varios fármacos, resultando en la disminución de su efecto clínico e incluso el incremento de los efectos adversos [44]. Por estos motivos, es importante analizar el comportamiento de las AgNPs frente a los cambios de pH.

Se estudió la estabilidad de las AgNPs azules en dispersión frente a distintos pH. Se obtuvieron los espectros UV-visibles de dispersiones a pH 4 y pH 10 y se compararon con el espectro a pH 7. Para esto se tomaron sendas alícuotas de 1 mL de dispersión de AgNPs y se agregaron 5  $\mu$ L de solución de ácido nítrico 65 % p/p en una de ellas y 5  $\mu$ L de solución de NaOH 1N en la otra. Se midió el pH de cada una mediante tiras reactivas.

De los espectros obtenidos, mostrados en la figura 4.8, puede verse que a pH 4, la estabilidad de las AgNPs azules disminuye notablemente, ya que no se observa el pico de SPR característico en 700 nm, ni se ve el pico a 350 nm que, se produce por la resonancia de los plasmones superficiales en los bordes angulares de los nanoprismas [45]. Además, se observó inmediatamente la formación de un precipitado oscuro en el fondo de la celda, indicando que se produjo la aglomeración de las nanopartículas.

En el caso de las dispersiones llevadas a pH 10, se observa un pico de SPR a una longitud de 600 nm, un valor menor que para las dispersiones a pH 7 y con una intensidad también menor. Esto indicaría, por un lado, que disminuye la concentración de AgNPs en la dispersión y, por otro lado, que las nanopartículas tienen un tamaño levemente menor que aquellas que les dieron origen a pH 7. Resultados similares fueron encontrados por Fernando *et al*, quienes estudiaron el efecto del pH sobre la estabilidad y cinética de disolución de AgNPs esféricas de distintos tamaños. Según estos autores, cuando las AgNPs se encuentran en soluciones ácidas con alta  $[H^+]$  se desestabilizan y forman agregados debido a introducción de cargas positivas que interaccionan fuertemente con las AgNPs [46]. En el caso particular de las AgNPs citratadas, la aglomeración a pH ácido sea probablemente producida por la protonación de los aniones citrato del *capping*, los que mantienen la estabilidad del coloide mediante repulsiones electrostáticas [47]. Al aumentar el pH se alcanza un mayor grado de

desprotonación, aumentando simultáneamente la carga negativa superficial. Sin embargo, a pH 10, la agregación de nanopartículas es evidente por la disminución de la intensidad de la banda SPR. Este comportamiento en medios alcalinos ha sido observado previamente por otros autores [48].

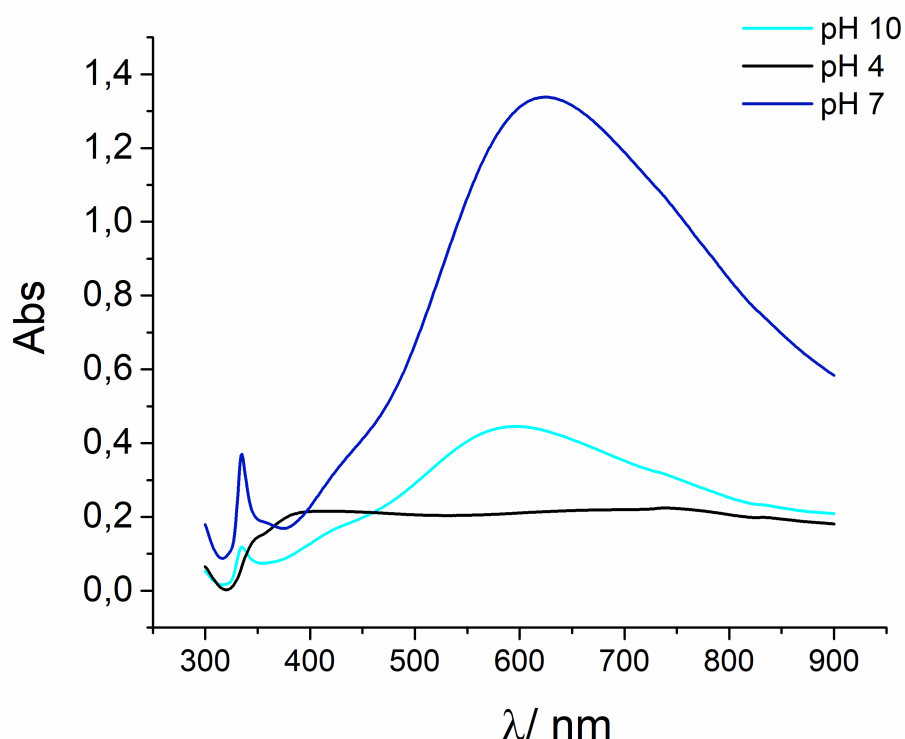


Figura 4.8: Espectros UV-visible de las AgNPs azules expuestas a distintos pHs, mediante adición de ácido o base según corresponda.

## 4.5 Estudios de la adsorción de AgNPs sobre Ti

### 4.5.1 Adsorción de AgNPs sobre titanio

Se modificaron las superficies de discos de titanio de 1cm de diámetro (99,9%, Advent Research Materials) previamente pulidos hasta grado especular con pasta de diamante, lavados con agua destilada en baño ultrasónico durante 15 min y finalmente enjuagados con agua Milli-Q. El proceso de adsorción se realizó mediante inmersión de los sustratos limpios en la respectiva dispersión de AgNPs durante 1, 3 y 24 horas, con el objetivo de evaluar si el tiempo de inmersión influye sobre la cantidad de AgNPs que

se adsorben sobre la superficie. Luego de la inmersión, se lavaron con agua Milli-Q y se dejaron secar al resguardo de la luz.

#### 4.5.2 Cubrimiento de sustratos con AgNPs a diferentes tiempos

Se analizaron por AFM sustratos de titanio modificados con AgNPs amarillas y azules a los diferentes tiempos de inmersión, tomando 10 imágenes de  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  o de  $15 \times 15 \mu\text{m}^2$  de diferentes zonas. Las medidas se realizaron por cuadruplicado. En la figura 4.9 se muestran imágenes representativas de los sustratos modificados a 1, 3 y 24 h para cada tipo de nanopartículas. Se puede observar que en todos los casos algunas nanopartículas individuales, pero en su mayoría se forman aglomerados de AgNPs sobre la superficie. Las secciones transversales de las imágenes de 24h muestran el gran tamaño que estos aglomerados tienen, superando los 100 nm en el caso de las AgNPs azules. puede notarse, además, que hay una leve disminución del cubrimiento luego de 24 h de inmersión.

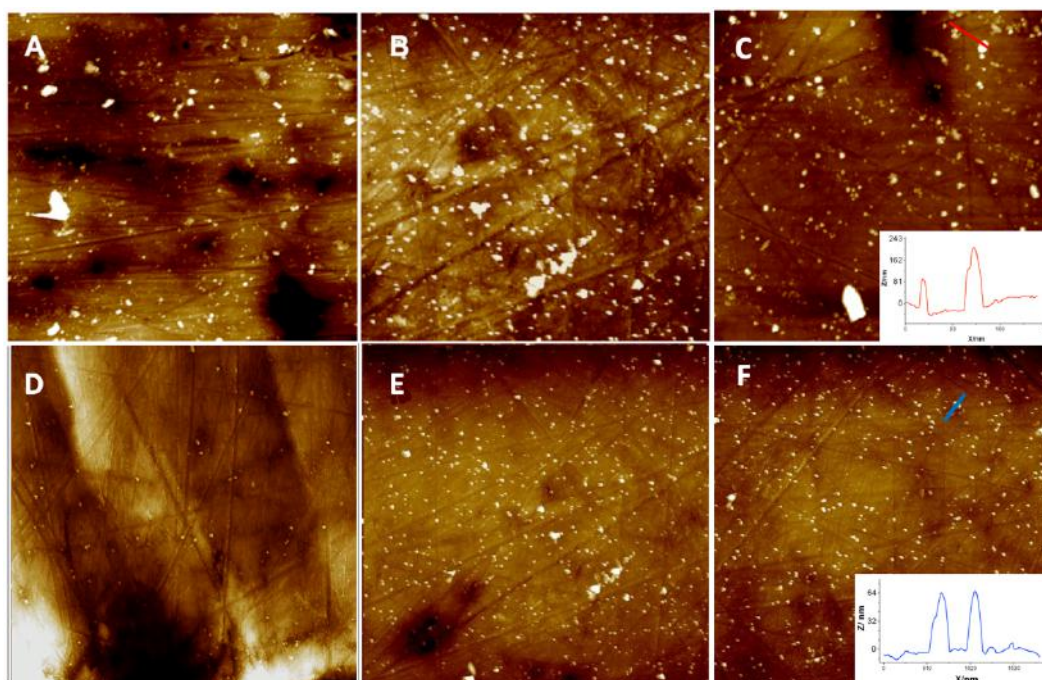


Figura 4.9: imágenes AFM de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  de sustratos de titanio modificados con AgNPs azules por A: 1h, B: 3h, C: 24h y con AgNPs amarillas por D: 1h y E: 3h ; F: AgNPs amarillas por 24h, imágenes de  $15 \times 15 \mu\text{m}$ . Se muestran las secciones trasversales de C) y F) con agregados de 180 nm y 65 nm de altura, respectivamente.

Asimismo, se analizó el grado de cubrimiento a partir de las imágenes AFM calculando, mediante el software ImageJ, el porcentaje de área cubierta respecto del área total, debido a que en los agregados no se puede cuantificar el número de nanopartículas que los integran. Los resultados se muestran en la Tabla 4.3, donde se aprecia que el grado de cubrimiento aumenta cuando el tiempo de inmersión aumenta de 1 a 3 horas para ambos tipos de AgNPs, y luego disminuye levemente al pasar las 24 h. Estos datos son coherentes con el fenómeno de desorción que describen Oćwieja y colaboradores al estudiar la cinética de adsorción/desorción de AgNPs sobre mica [49], donde observan por un lado, que el grado de cubrimiento depende proporcionalmente a la fuerza iónica y de la concentración de la solución de AgNPs; y por otra parte que se alcanza un cubrimiento máximo, dependiente del tiempo de inmersión con  $t^{1/2}$ . adicionalmente, para dispersiones de concentración < 20 ppm (como es el caso de las AgNPs sintetizadas en este trabajo) se produce una desorción de las AgNPs, principalmente las más pequeñas, que determina una disminución en el cubrimiento a largos tiempos de inmersión [49].

Tabla 4.3: Cubrimiento de AgNPs en función del tiempo de modificación para cada tipo de AgNPs

Tiempo de inmersión en la dispersión	AgNPs azules (% área cubierta)	AgNPs amarillas (% área cubierta)
1h	$1,3 \pm 0,3$	$1 \pm 0,3$
3hs	$1,93 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,6$
24hs	$1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,5$

Por otro lado, se cuantificó la plata total adsorbida luego de 3h de inmersión de los sustratos en cada dispersión de AgNPs, obteniendo como resultado  $0,34 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para AgNPs azules y amarillas, respectivamente. Estos valores indican que sobre titanio se adsorbe espontáneamente una cantidad relativamente pequeña de plata.

#### 4.5.2 Cinética de adsorción mediante microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)

Se estudió la cinética de adsorción de AgNPs azules sobre la superficie de Ti utilizando una QCM. Para realizar las medidas, se colocaron 2 mL de la dispersión de AgNPs azules a temperatura ambiente sobre el disco de cuarzo en la celda correspondiente, cubriéndola para evitar evaporaciones. Se registró la frecuencia de resonancia del cristal ( $f$ ) durante un período de 24 horas y se graficaron los resultados como se muestran en la figura 4.10.

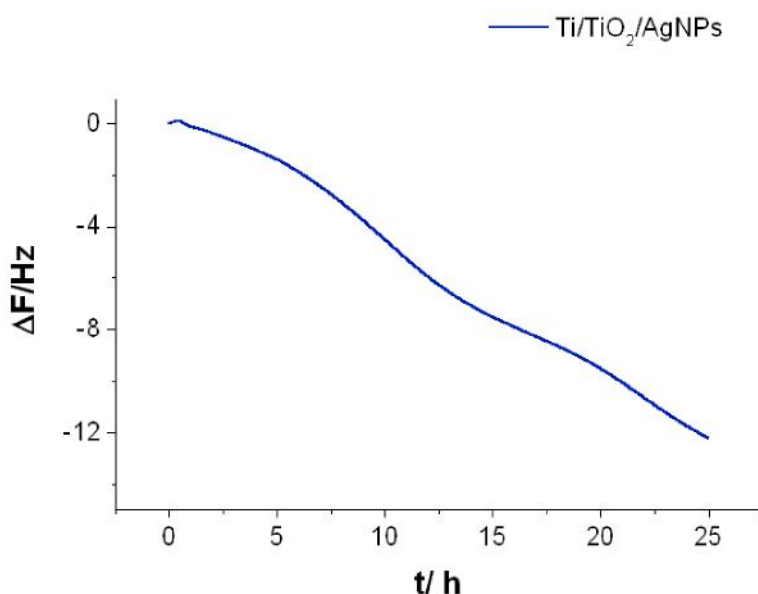


Figura 4.10: Cambio de frecuencia en el sensor en función del tiempo para la adsorción de AgNPs azules sobre Ti durante 24 h a temperatura ambiente. Se observa la disminución de la frecuencia  $f$  a medida que las nanopartículas se

Como puede observarse, el cambio en la frecuencia del cristal fue de 12 Hz, lo que equivale, según la ecuación de Sauberbrey (Capítulo 2, sección 2.2.5), a una deposición total de  $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Para un período de deposición de 3 horas, el cambio de frecuencia es de aproximadamente 0,8 Hz, que se corresponde con aproximadamente  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Este valor coincide en orden de magnitud con la cantidad de plata determinada mediante cuantificación de iones. Cabe

mencionar que los resultados que se presentan son preliminares, ya que, debido a un mal funcionamiento posterior del sensor de Ti, no se pudieron llevar a cabo duplicados de las experiencias que permitan confirmar estos valores.

Estos experimentos se incluyen en esta tesis como antecedente de la preparación de sensores de Ti y estudio de adsorción sobre este material mediante QCM.

## 4.6 Conclusiones

Se optimizó la ruta de síntesis de AgNPs para obtener dispersiones estables y nanopartículas con características fisicoquímicas reproducibles. Las nanopartículas así preparadas pueden almacenarse por al menos 3 meses sin que modifiquen mayormente sus propiedades.

Se estudió la estabilidad de las AgNPs a diferentes pH. Las nanopartículas mostraron ser estables a pH alcalino o neutro, mientras que a pH ácido la dispersión se desestabiliza, produciéndose la precipitación de las nanopartículas. En consecuencia, los ensayos posteriores utilizando la dispersión de AgNPs se realizaron a pH aproximadamente neutro.

Se modificaron sustratos de titanio con AgNPs de diferentes tamaños, a partir de un método sencillo y rápido, que consiste simplemente en la inmersión de los sustratos en la dispersión de AgNPs. Sobre la superficie se forman mayoritariamente agregados de nanopartículas, que acrecientan su tamaño con el aumento del tiempo de inmersión del sustrato en la dispersión. Por otro lado, el cubrimiento superficial depende en cierta medida del tiempo de inmersión de los sustratos. La cantidad de Ag total adsorbida sobre la superficie luego de 3 h de inmersión es  $0,34 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para AgNPs azules y amarillas, respectivamente. Por lo tanto, se decidió utilizar como metodología de funcionalización superficial 3 h de inmersión, ya que los tiempos cortos son más prácticos a la hora de realizar los ensayos.



#### 4.7 Bibliografía

- [1] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, 'The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment', *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 3, pp. 668–677, Jan. 2003.
- [2] D. M. Mott and S. Maenosono, 'Manipulation of the Electronic Properties of Gold and Silver Core – Shell Nanoparticles', in *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine, and Bioelectronic Devices*, vol. 1, C.-J. Z. Maria Hepel, Ed. American Chemical Society, 2012, pp. 327–358.
- [3] R. El-Dessouky, M. Georges, and H. M. E. Azzazy, 'Silver nanostructures: Properties, synthesis, and biosensor applications', *ACS Symp. Ser.*, vol. 1112, pp. 359–404, Jan. 2012.
- [4] M. Yang, J. Wang, and F. Zhou, *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine, and Bioelectronic Devices Volume 1*, vol. 1112. Washington, DC: American Chemical Society, 2012.
- [5] P. Mukherjee *et al.*, 'Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis', *Nano Lett.*, vol. 1, no. 10, pp. 515–519, 2001.
- [6] S. Chernousova and M. Epple, 'Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal', *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 52, no. 6. pp. 1636–1653, 04-Feb-2013.
- [7] T. Huang, P. D. Nallathamby, D. Gillet, and X. H. N. Xu, 'Design and synthesis of single-nanoparticle optical biosensors for imaging and characterization of single receptor molecules on single living cells', *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 20, pp. 7708–7718, Oct. 2007.
- [8] T. I. Shaheen and A. A. Abd El Aty, 'In-situ green myco-synthesis of silver nanoparticles onto cotton fabrics for broad spectrum antimicrobial activity', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 118, pp. 2121–2130, Jul. 2018.
- [9] N. Tra Thanh *et al.*, 'Optimization and characterization of electrospun polycaprolactone coated with gelatin-silver nanoparticles for wound healing application', *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 91, pp. 318–329, Oct. 2018.
- [10] M. Di Ventra, S. Evoy, and J. R. Heflin, *Introduction to Nanoscale Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, 2004.
- [11] A. Zielińska, E. Skwarek, A. Zaleska, M. Gazda, and J. Hupka, 'Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size', in *Procedia Chemistry*, 2009, vol. 1, no. 2, pp. 1560–1566.
- [12] P. K. Khanna, N. Singh, D. Kulkarni, S. Deshmukh, S. Charan, and P. V. Adhyapak, 'Water based simple synthesis of re-dispersible silver nano-particles', *Mater. Lett.*, vol. 61, no. 16, pp. 3366–3370, Jun. 2007.
- [13] J. Nishino and Y. Kanno, 'An influence of concentration of polyvinylpyrrolidone on the morphology of silver metal formed from AgN O3 aqueous solution', *J.*

*Nanomater.*, vol. 2008, no. 1, pp. 1–5, Feb. 2008.

- [14] A. Voronov, A. Kohut, S. Vasylyev, and W. Peukert, 'Mechanism of silver ion reduction in concentrated solutions of amphiphilic invertible polyesters in nonpolar solvent at room temperature.', *Langmuir*, vol. 24, no. 21, pp. 12587–94, Nov. 2008.
- [15] D.-H. Chen and Y.-W. Huang, 'Spontaneous formation of Ag nanoparticles in dimethylacetamide solution of poly(ethylene glycol).', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 255, no. 2, pp. 299–302, Nov. 2002.
- [16] Q. Shen, Q. Min, J. Shi, L. Jiang, W. Hou, and J.-J. Zhu, 'Synthesis of stabilizer-free gold nanoparticles by pulse sonoelectrochemical method', *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, no. 1, pp. 231–237, Jan. 2011.
- [17] V. Sáez and T. Mason, 'Sonoelectrochemical Synthesis of Nanoparticles', *Molecules*, vol. 14, no. 10, pp. 4284–4299, Oct. 2009.
- [18] H. Ma *et al.*, 'Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method', *ChemPhysChem*, vol. 5, no. 1, pp. 68–75, Jan. 2004.
- [19] A. H. Tanzil, S. T. Sultana, S. R. Saunders, L. Shi, E. Marsili, and H. Beyenal, 'Biological synthesis of nanoparticles in biofilms', *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 95, pp. 4–12, Dec-2016.
- [20] Y. Xue, G. Yu, Z. Shan, and Z. Li, 'Phyto-mediated synthesized multifunctional Zn/CuO NPs hybrid nanoparticles for enhanced activity for kidney cancer therapy: A complete physical and biological analysis', *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 186, pp. 131–136, Sep. 2018.
- [21] N. T. K. Thanh, N. Maclean, and S. Mahiddine, 'Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution', *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 15, pp. 7610–7630, 13-Aug-2014.
- [22] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, and M. A. El-Sayed, 'Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes', *Chemical Reviews*, vol. 105, no. 4, American Chemical Society, pp. 1025–1102, 2005.
- [23] S. B. Sant, *Nanoparticles: From Theory to Applications*, vol. 27, no. 12, 2012.
- [24] \* Brian L. Cushing, and Vladimir L. Kolesnichenko, and C. J. O'Connor\*, 'Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles', 2004.
- [25] C. Y. Flores *et al.*, 'Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 350, no. 2, pp. 402–408, 2010.
- [26] K. D. Dobson and A. J. McQuillan, 'In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aliphatic carboxylic acids to TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> from aqueous solutions', *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 55, no. 7–8, pp. 1395–1405, 1999.
- [27] L. Ojamäe, C. Aulin, H. Pedersen, and P. O. Käll, 'IR and quantum-chemical

- studies of carboxylic acid and glycine adsorption on rutile TiO<sub>2</sub> nanoparticles', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 296, no. 1, pp. 71–78, Apr. 2006.
- [28] A. D. Weisz, A. E. Regazzoni, and M. A. Blesa, 'ATR-FTIR study of the stability trends of carboxylate complexes formed on the surface of titanium dioxide particles immersed in water', *Solid State Ionics*, vol. 143, no. 1, pp. 125–130, Jun. 2001.
  - [29] A. J. Frank, N. Cathcart, K. E. Maly, and V. Kitaev, 'Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: A first-year undergraduate experiment exploring plasmonic nanoparticles', *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 10, pp. 1098–1101, 2010.
  - [30] J. E. Millstone, S. J. Hurst, G. S. Métraux, J. I. Cutler, and C. A. Mirkin, 'Colloidal gold and silver triangular nanoprisms', *Small*, vol. 5, no. 6, pp. 646–664, 20-Mar-2009.
  - [31] G. S. Métraux and C. A. Mirkin, 'Rapid thermal synthesis of silver nanoprisms with chemically tailorable thickness', *Adv. Mater.*, vol. 17, no. 4, pp. 412–415, Feb. 2005.
  - [32] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, 'Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences', *Biophysical Reviews*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016.
  - [33] S. Mukherji, S. Bharti, G. Shukla, and S. Mukherji, 'Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles', *Phys. Sci. Rev.*, vol. 0, no. 0, Aug. 2018.
  - [34] R. Desai, V. Mankad, S. Gupta, and P. Jha, 'Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment', *Nanosci. Nanotechnol. Lett.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–34, 2012.
  - [35] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, 'Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver', *Nanoscale*, vol. 5, no. 16, pp. 7328–7340, 2013.
  - [36] S. He *et al.*, 'Formation of Silver Nanoparticles and Self-Assembled Two-Dimensional Ordered Superlattice', 2001.
  - [37] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, 'Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy', *RSC Adv.*, vol. 4, no. 8, pp. 3974–3983, 2014.
  - [38] G. P. Lee, A. I. Minett, P. C. Innis, and G. G. Wallace, 'A new twist: Controlled shape-shifting of silver nanoparticles from prisms to discs', *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 44, pp. 8294–8298, Nov. 2009.
  - [39] P. Yu, J. Huang, and J. Tang, 'Observation of Coalescence Process of Silver Nanospheres During Shape Transformation to Nanoprisms', *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, Dec. 2011.
  - [40] X. Jiang, Q. Zeng, and A. Yu, 'Thiol-frozen shape evolution of triangular silver

- nanoplates', *Langmuir*, vol. 23, no. 4, pp. 2218–2223, 2007.
- [41] G. Si, W. Shi, K. Li, and Z. Ma, 'Synthesis of PSS-capped triangular silver nanoplates with tunable SPR', *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 380, no. 1–3, pp. 257–260, May 2011.
  - [42] S. Bhattacharjee, 'DLS and zeta potential - What they are and what they are not?', *Journal of Controlled Release*, vol. 235. Elsevier, pp. 337–351, Aug-2016.
  - [43] A. Punnia-Moorthy, 'Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and staphylococcus aureus', *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 36–44, 1987.
  - [44] H. Tsuchiya, 'Local anesthetic failure associated with inflammation: verification of the acidosis mechanism and the hypothetic participation of inflammatory peroxynitrite', *J. Inflamm. Res.*, p. 41, Nov. 2008.
  - [45] R. I. MacCuspie, 'Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions', *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 7, pp. 2893–2908, Jul. 2011.
  - [46] I. Fernando and Y. Zhou, 'Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles', *Chemosphere*, vol. 216, pp. 297–305, Feb. 2019.
  - [47] R. I. MacCuspie, 'Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions', *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 7, pp. 2893–2908, Jul. 2011.
  - [48] P. Béteky *et al.*, 'Silver nanoparticles: Aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity', *Int. J. Nanomedicine*, vol. 14, pp. 667–687, Jan. 2019.
  - [49] M. Oćwieja, Z. Adamczyk, and K. Kubiak, 'Tuning properties of silver particle monolayers via controlled adsorption-desorption processes', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 376, no. 1, pp. 1–11, Jun. 2012.

# Capítulo 5:

## Modificación de superficies con lactoferrina bovina y AgNPs

*“Somos como enanos aupados a hombros de gigantes, de manera que podemos ver más cosas y más lejanas que ellos, no por la agudeza de nuestra vista o por nuestra elevada estatura, sino porque estamos alzados sobre ellos y nos elevamos sobre su altura gigantesca” Bernardo de Chartres*



## 5.1 Introducción

En la actualidad, el mercado de implantes y materiales biocompatibles continúa creciendo, con ventas billonarias en todo el mundo [1]. Sin embargo, aún sigue siendo importante el porcentaje de incidencia de fracasos postquirúrgicos, llegando en algunos casos hasta un 10%. Las causas preponderantes de estos fracasos son las infecciones bacterianas o una pobre osteointegración [2]. Una buena osteorregeneración e integración con los tejidos son características esenciales que debe tener todo material implantable, y por lo tanto, deben ser considerados a la hora del diseño de los mismos [3].

El hueso es un tejido altamente especializado con muchas funciones avanzadas. Durante el desarrollo, éste reemplaza el tejido mesenquimal sólido y avascular principalmente por cartílago mineralizado o fibrocartílago [4]. Estos tejidos son importantes ya que el hueso es un órgano vivo con componentes celulares y estructurales que tienen funciones ontogénicas y bioquímicas definidas. Este componente, llamado matriz extracelular, se encuentra separado del fluido extracelular general por una delgada capa epitelial de osteoblastos, que secretan matriz orgánica y permanecen como un epitelio estrecho que controla el entorno para la mineralización. Durante el crecimiento continuo, algunos de estos osteoblastos son incorporados como osteocitos en esta matriz y forman parte de este órgano [5].

Los huesos de mamíferos y sus dientes están compuestos por cristales inorgánicos y proteínas con un porcentaje en peso de aproximadamente 70% en componentes inorgánicos, 20% proteínas, y 10% de agua. Estos componentes se encuentran bien organizados, los cristales se depositan en la matriz proteica, contribuyendo a la rigidez del tejido y su resistencia a las fuerzas compresivas. El componente inorgánico en mayor proporción es la hidroxiapatita, una fase termodinámicamente estable de fosfato de calcio [6] en forma de cristal hexagonal de composición  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ . El componente proteico en mayor proporción es el Colágeno Tipo I, cuyas moléculas se autoensamblan en fibras resistentes y le dan al hueso resiliencia. Estas fibras son importantes para la calcificación de la matriz, ya que son secretadas primeramente por los osteoblastos para luego depositar en ellas los cristales de hidroxiapatita. El proceso de biomineralización de la matriz se produce mediante nucleación y crecimiento, en el cual se requiere una forma y tamaño adecuados de los cristales para un correcto desarrollo del hueso. Además, están

presentes ciertas proteínas como la osteocalcina que controlan este crecimiento regulando la formación de los cristales [7], [8].

Para inducir la regeneración ósea requerida en ciertos casos luego de la inserción de un implante metálico en el cuerpo, se deben generar condiciones superficiales adecuadas para una correcta adhesión, proliferación y diferenciación de las células del tejido de manera de favorecer la producción de matriz mineralizada y la formación de hueso nuevo. Hasta hace no muchos años, sólo se pensaba en la osteointegración y biocompatibilidad como objetivo principal a la hora de diseñar un biomaterial. Recientemente, las investigaciones se han dedicado al diseño de materiales que tengan diferentes propiedades simultáneamente. En este sentido, algunos de los desarrollos más recientes incluyen superficies que combinan ácido hialurónico y quitosano con el péptido de adhesión celular RGD sobre Ti/TiO<sub>2</sub> logrando propiedades antimicrobianas y a la vez una buena integración con células osteogénicas [9] ; o nanotubos de titanio cargados con antibióticos [10] o AgNPs [11], quitosano [12] o péptidos antimicrobianos [13]. Todos estos sistemas logran las características buscadas en el biomaterial, sin embargo, estas estrategias pueden tener algunas desventajas como, por ejemplo, procesos de fabricación complejos o engorrosos con requerimientos de equipamiento específico, degradación del polímero en condiciones fisiológicas, o, lo que es más importante, la liberación no controlada de antimicrobianos que pueden causar citotoxicidad [14] e inducir resistencia bacteriana [15].

En este capítulo se describen los resultados obtenidos al funcionalizar por un lado, AgNPs con lactoferrina bovina y por otro lado, de titanio con Lf combinada con AgNPs, con el objetivo de optimizar el desempeño del material desde el punto de vista de sus propiedades antimicrobianas y osteoreparadoras. Asimismo, se ensayó la modificación de AgNPs con Lf con el fin de aumentar la capacidad antimicrobiana de éstas.

### **5.1.2 Descripción de la lactoferrina**

La lactoferrina es una proteína bioactiva perteneciente a la familia de las transferrinas que se encuentra en mayor cantidad en la leche de mamíferos y epitelio de las mucosas. Tiene un peso molecular de 75-86 kDa aproximadamente, con 16 puentes disulfuros intramoleculares. Su principal característica es la capacidad de unir fuertemente al hierro, produciendo un complejo rojo salmón en solución. Su afinidad por el hierro es 3000 veces más alta que las demás transferrinas [16].



En la mayoría de las células epiteliales de fluidos exócrinos, como saliva, lágrimas, fluidos gástricos y leche principalmente, la proteína es secretada en forma libre de hierro (apo-Lf), que luego irá captando iones férricos hasta su saturación (holo-Lf).

En 1992, Bellamy *et al*, identificaron una porción de aminoácidos del extremo aminoterminal de la Lf que retiene su actividad biológica cuando se aísla del resto de la molécula, esta porción se denomina lactoferricina (Lfc), es un péptido catiónico que deriva de la hidrólisis del dominio N de la Lf con la enzima pepsina [17], se libera de manera natural en el organismo debido a la acción de la pepsina gástrica. En diversos estudios se ha confirmado que la actividad bactericida de la Lfc es mayor que la de la Lf y que dicha actividad no involucra el sitio de unión a hierro, sino a que, debido a su tamaño, puede introducirse fácilmente en la superficie bacteriana y actuar directamente sobre la membrana interna [18]. Otras propiedades antimicrobianas atribuidas a la Lfc incluyen su capacidad de bloquear la adherencia bacteriana y de inhibir la invasión de bacterias patógenas intracelulares [19].

#### *Estructura:*

La molécula de Lf, está formada por una cadena polipeptídica simple de 700 aminoácidos, plegada en dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C, señalados como N1, N2 y C1, C2 en la figura 5.1) conectados por una región bisagra [20]. Cada lóbulo es capaz de unir un átomo de  $\text{Fe}^{+2}$  o  $\text{Fe}^{+3}$ , aunque también puede unirse a iones  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$ . [21] Esta glicoproteína presenta una carga neta positiva con un punto isoeléctrico (pI), entre 8.0 y 8.5 y 4 sitios potenciales de N-glicosilación [22].

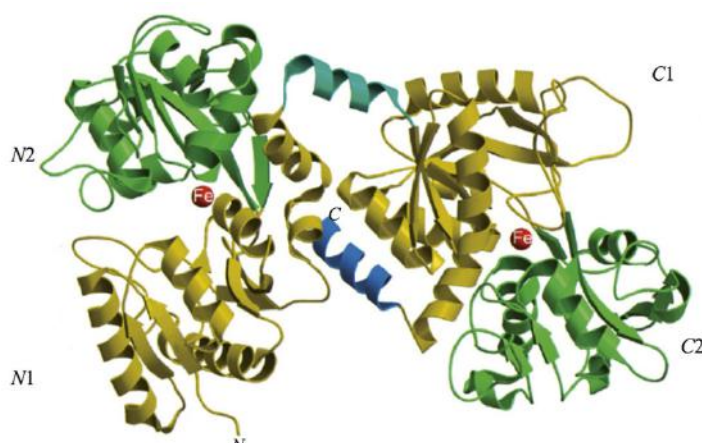


Figura 5.1: Molécula de lactoferrina. Los lóbulos N y C se subdividen en N 1 y 2 y C 1 y 2 respectivamente. Cada lóbulo es capaz de unir un átomo de  $\text{Fe}^{+3}$  que se muestra en rojo

### *Función:*

Desde su descubrimiento en las leches bovina y humana, se ha investigado cuantiosamente, intentando esclarecer las funciones de la lactoferrina. Inicialmente se pensaba que actuaba únicamente como transportador de metales esenciales en el recién nacido. Posteriormente, se comprobó que la Lf es un componente importante del sistema inmune innato, y que exhibe propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales, entre otras. Esta glicoproteína inhibe tanto el crecimiento de bacterias Gram (+) como Gram (-), entre ellas, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, etc.[20]–[22].

La molécula de lactoferrina protege a los mamíferos de las infecciones bacterianas mediante mecanismos directos e indirectos. Los primeros comprenden a las actividades bacteriostáticas y bactericidas, mientras que los mecanismos indirectos se basan en la prevención de la adherencia de los patógenos a las células eucariotas y en la modulación del sistema inmune.

La actividad bacteriostática de la Lf se debe a su capacidad de capturar  $\text{Fe}^{+3}$ , limitando la disponibilidad de este ion como nutriente para las bacterias en el sitio de infección, causando de esta forma la inhibición del crecimiento bacteriano y la disminución de expresión de factores de virulencia [18]. Sin embargo, la bacteriostasis es únicamente una medida que produce un efecto antimicrobiano temporal y muchas bacterias han desarrollado mecanismos para recuperar el hierro secuestrado por la Lf a través de la síntesis de moléculas sideróforas [23].

La función bactericida se le atribuye a una interacción directa con la superficie microbiana. Dicha interacción puede producirse tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-). En bacterias Gram (-), como *Vibrio cholerae* y *E. coli*, se ha detectado la interacción de la Lf con la superficie bacteriana, mediante el extremo N terminal de la proteína, seguida de la liberación de lipopolisacárido (LPS), el aumento en la permeabilidad de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria (figura 5.2). El LPS es el componente endotóxico de la pared celular de las bacterias Gram negativas, que se adhiere a receptores de la célula hospedadora, como uno de los primeros pasos para la infección [24], [25]. El mecanismo de acción sobre las bacterias Gram (+) está basado en la unión de la proteína a moléculas cargadas negativamente que se encuentran en la superficie bacteriana, lo que resulta en una disminución de la carga neta negativa de

la pared celular y esto favorece el contacto entre la lisozima y el peptidoglicano sobre el que ejerce su acción [20].

Otra función muy importante que se le ha encontrado a la Lf en su forma de apo-proteína es que tiene la capacidad de suprimir el desarrollo de biofilm de algunos patógenos como *P. aeruginosa*. Se han reportado estudios donde se inmoviliza la Lf de diferentes formas sobre superficies abióticas y logran obtener superficies antimicrobianas. Por ejemplo, se ha logrado inhibir la adhesión de *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita de la superficie dental mediante Lf a través de su extremo C terminal [26]. Otro estudio propone la inmovilización covalente de Lfc sobre titanio como plataforma anti-biofilm [27]; y existen también estudios de nanopartículas recubiertas con Lf con diferentes propósitos, como transportadoras de drogas [28] o anticancerígenos. Kabary *et al.* [29] modificaron nanopartículas lipídicas con la proteína cargada positivamente y el anión del ácido hialurónico utilizando la técnica de capa por capa para obtener nanotransportadores específicos como tratamiento del cáncer de pulmón.

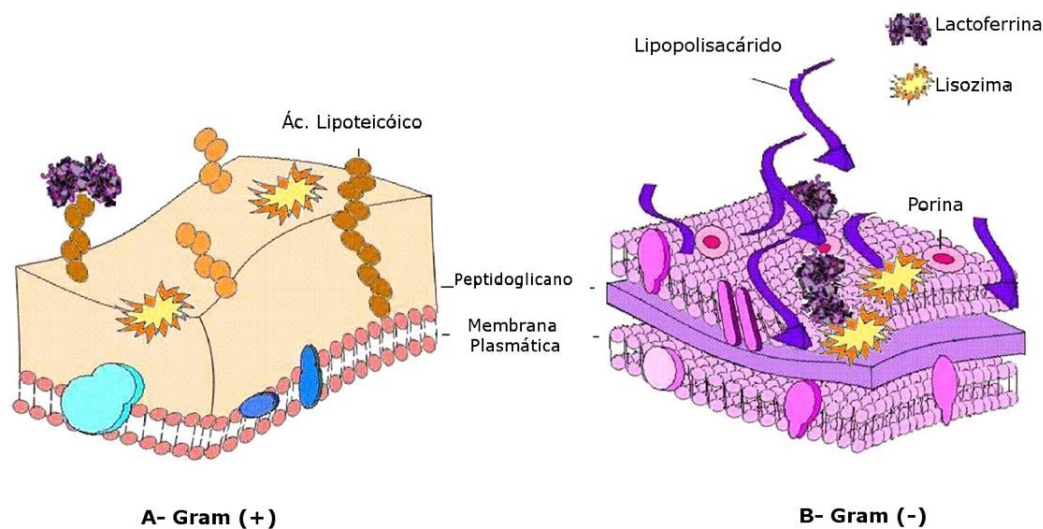


Figura 5.2: Mecanismo de acción antibacteriana de la Lf. (A) Gram (+): Lf se une a moléculas con carga negativa como ácidos lipoteicoicos, neutralizando la carga de la pared y permitiendo la acción de otros agentes antimicrobianos como lisozimas. (B) Gram (-): Lf se une al lípido A del LPS causando su desprendimiento y por ende daño a la membrana celular.

A nivel sistémico y local, la lactoferrina regula la función de componentes humorales y celulares de la respuesta inmune innata como pueden ser neutrófilos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T, interferón  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) e IFN  $\beta$ , interleucina 18 (IL-18). Conjuntamente, incide sobre la respuesta inmune adaptativa a través de la regulación en la producción de anticuerpos, linfocitos Th-1/Th-2 y linfocitos B. Esta acción moderadora posibilita la regulación positiva o negativa de inflamaciones infecciosas. La activación de células inmunes y la producción de estas moléculas se produce como resultado de la modulación de la expresión de genes involucrados en estas funciones, a través de su unión con receptores específicos presentes en la membrana celular [30].

En la figura 5.3 se resumen las diferentes funciones asociadas a la Lf descritas anteriormente. La variedad de propiedades beneficiosas de la Lf la posicionan como una potente biomolécula de interés para ser utilizada en el diseño de nuevos biomateriales. los objetivos de esta parte del trabajo son: la preparación de AgNPs modificadas con Lf y el diseño de superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> multifuncionalizadas con Lf y AgNPs. Para cada uno de los sistemas antes mencionados se realizaron ensayos in vitro de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando como modelo *S. aureus* y ensayos de citotoxicidad con células osteoblásticas.

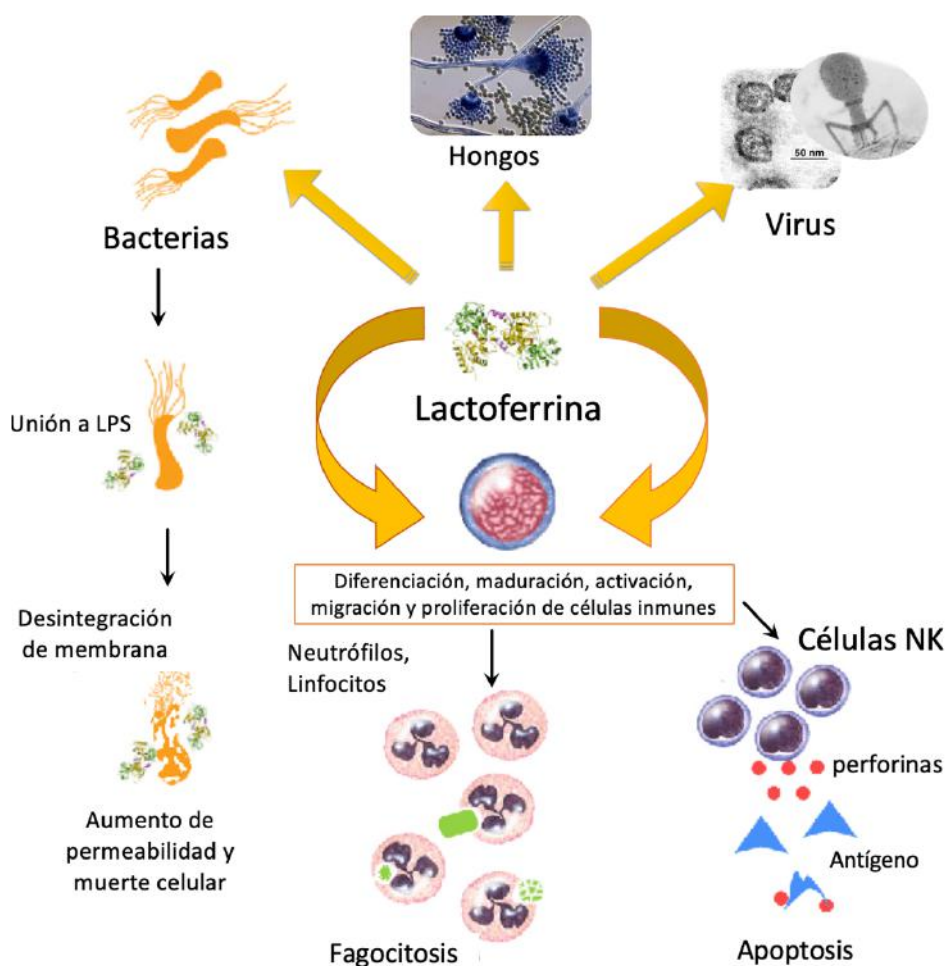


Figura 5.3: Diferentes funciones asociadas a la lactoferrina.

## 5.2 Funcionalización de AgNPs con lactoferrina bovina

Se desarrolló una ruta de funcionalización de AgNPs azules con Lf y se caracterizó el sistema obtenido, con el fin de analizar un posible efecto sinérgico en la capacidad antimicrobiana de ambas, y un aumento de la biocompatibilidad y mejor interacción con células eucariotas, ya sea en solución o bien ancladas a una superficie.

Para la funcionalización de las AgNPs se pesó 1 mg de Lf [31] y luego se disolvió en 1 mL de dispersión de AgNPs azules, siguiendo la metodología reportada por Pissinis *et al.* para funcionalizar estas mismas AgNPs con antibióticos [32]. Luego de 24 h a temperatura ambiente (figura 5.4), se separaron las nanopartículas funcionalizadas mediante centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se retiró y se reservó para posterior análisis, mientras que el pellet de nanopartículas se

resuspendió en buffer fosfato para mantener la estabilidad de la dispersión. Se procedió a una nueva centrifugación siguiendo la metodología anterior con el fin de extraer posibles excedentes de Lf no unida a las AgNPs. En simultáneo se realizó el mismo experimento utilizando un volumen igual de nanopartículas sin el agregado de Lf a modo de control metodológico. Como se describió antes, la Lf tiene un PI de 8,5 por lo que a pH 7 encuentra cargada positivamente. De esta forma, podría unirse por fuerzas electrostáticas al *capping* de citrato, cargado negativamente, de las AgNPs que se sintetizaron en este trabajo.

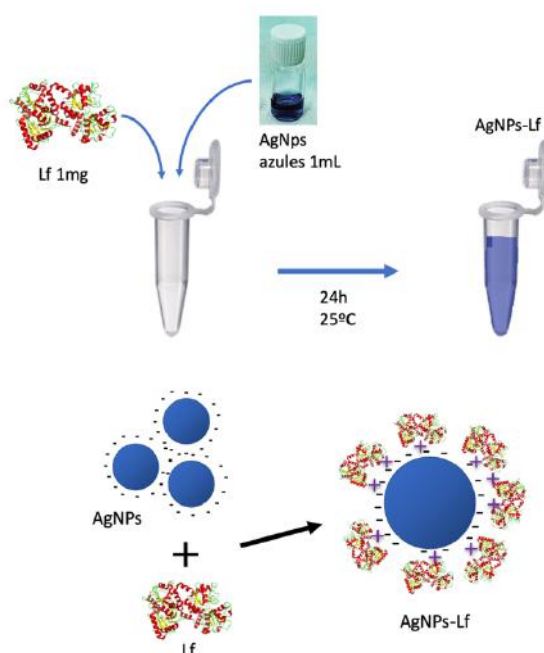


Figura 5. 4: Esquema de funcionalización de AgNPs con Lf

Con el objetivo de verificar la presencia de proteína en el sobrenadante se realizó un ensayo de Bradford en microplaca. El mismo consistió en colocar 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford y mezclarlo con 5  $\mu$ L de la muestra a analizar. Si la solución contiene proteínas, al cabo de unos segundos, el color cambiará de amarillo a azul, aumentando la intensidad del color con la concentración de proteína. La afinidad del colorante por la proteína es muy alta y permite detectar concentraciones del orden de los microgramos [33]. En la figura 5.5 se presenta una imagen de las soluciones obtenidas luego del ensayo. Puede verse que luego de la segunda centrifugación (sobrenadante 2, Sb II) ya

no se detecta proteína libre en el medio, por lo que se considera, entonces, que la purificación fue concluida.

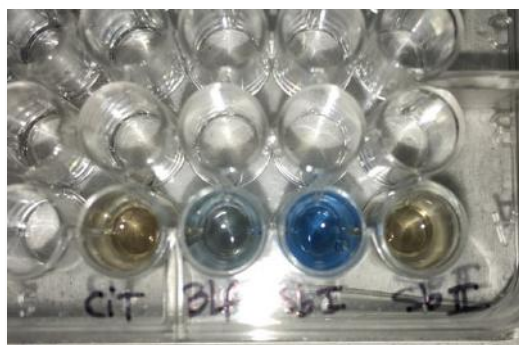


Figura 5.5: Fotografía de las soluciones obtenidas luego del ensayo de tinción de Bradford. Cit: solución de citrato (control negativo); Blf: solución 0.1 mg/mL de Lf (control positivo); Sb I y II: sobrenadantes de la 1er y 2da etapa de purificación. Luego de la segunda centrifugación no se detectó proteína en el medio.

Para caracterizar las AgNPs-Lf, en primer lugar se obtuvieron los espectros UV-vis de las dispersiones de nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar, que se muestran en la figura 5.6. Puede observarse que la posición del máximo de absorción en las AgNPs-Lf se corre ligeramente hacia longitudes de onda mayores, que puede atribuirse a un aumento del tamaño de las partículas[34], [35], o bien a una modificación en el entorno que altera la SPR [32].

El radio hidrodinámico promedio obtenido mediante DLS aumenta 15-20 nm respecto del correspondiente a las AgNPs (figura 5.7), consistente con la formación de una capa de proteína en la interfaz. Asimismo, el valor del potencial z medido para las AgNPs-Lf es  $8,1 \pm 1,2$  mV, mayor que el correspondiente para las AgNPs azules ( $-28,4 \pm 2,2$  mV, Capítulo 4, sección 4.2). El aumento en el valor del potencial z luego de la funcionalización es acorde a la incorporación de especies cargadas positivamente sobre la superficie, tal como la Lf a pH fisiológico [32], [36]. El cambio en el potencial zeta de nanopartículas modificadas con proteínas ha sido atribuido a interacciones iónicas que involucran residuos aminoácidos cargados positivamente [37], [38]. En un reciente trabajo de Nayak *et al.* se analiza la interacción AgNPs-Lf mediante ensayos calorimétricos y simulaciones de dinámica molecular, concluyendo que la interacción dominante en la adsorción de la proteína sobre la superficie de las nanopartículas son

fuerzas electrostáticas con alguna contribución de interacciones polares, tales como fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, que contribuyen, además, a la estabilización de la Lf sobre la superficie. Estos estudios demuestran, además que la fuerte interacción en la interfaz AgNP/Lf no afecta considerablemente la estructura nativa de la proteína [31].

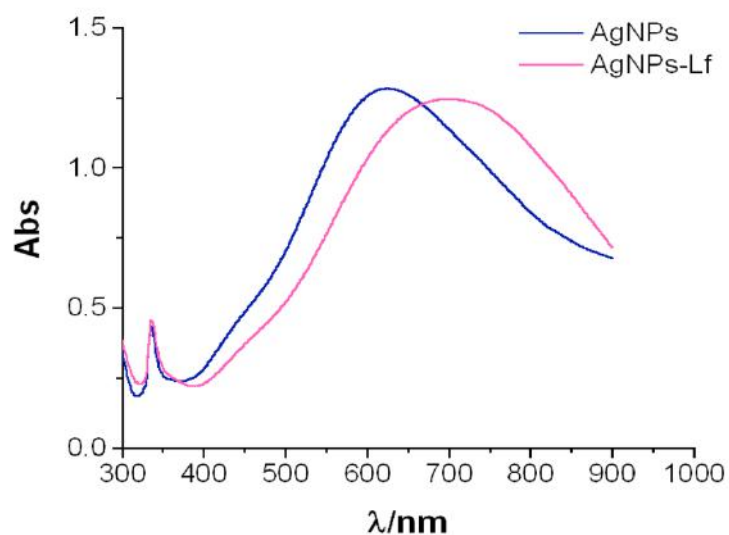


Figura 5.6: Espectros UV-Visible para las AgNPs azules y AgNPs-Lf.

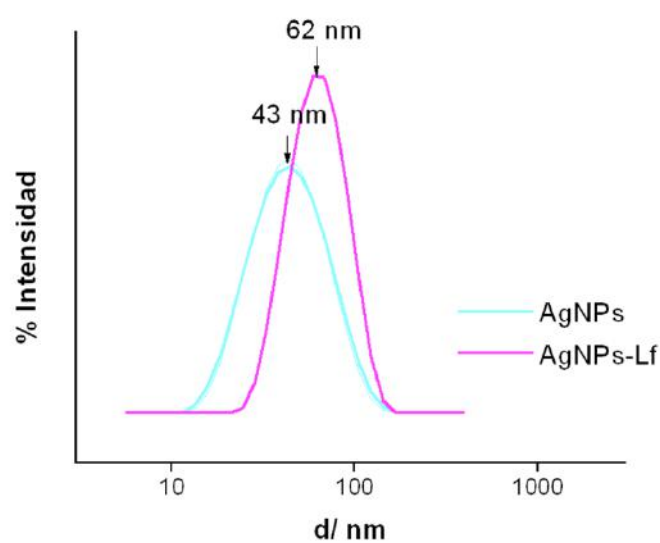


Figura 5.7: Señal obtenida para la dispersión dinámica de luz de las AgNPs con y sin Lf. Se ve el corrimiento hacia tamaños mayores.



Por otro lado, se ha reportado que la interacción de nanopartículas con proteínas puede llevar a la agregación de éstas y a la desestabilización de la dispersión de nanopartículas [39], [40], lo que no se observa en el caso de las AgNPs-Lf preparadas en este trabajo. La estabilidad de la dispersión de las nanopartículas modificadas con Lf ha sido atribuida a la formación de una barrera repulsiva estérica que previene la aglomeración de las AgNPs-Lf [31].

Consecutivamente, se analizaron las AgNPs-Lf mediante FTIR-ATR y se compararon los resultados con aquellos espectros obtenidos para las nanopartículas sin funcionalizar. Se utilizaron discos de titanio como superficie soporte sobre el que se colocaron gotas de cada una de las dispersiones y se dejaron secar al aire.

Si se analizan los diferentes espectros en la figura 5.8, se puede observar la una pequeña señal a  $1636\text{ cm}^{-1}$  y  $1541\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de las nanopartículas funcionalizadas, el cual se corresponde con la banda de estiramiento de los grupos N-H presentes en los enlaces amida I y II, respectivamente. Estos resultados son análogos a los encontrados por Kumari *et al.* al sintetizar nanopartículas con Lf, en donde observan también las bandas características de amida I y amida II, [41].

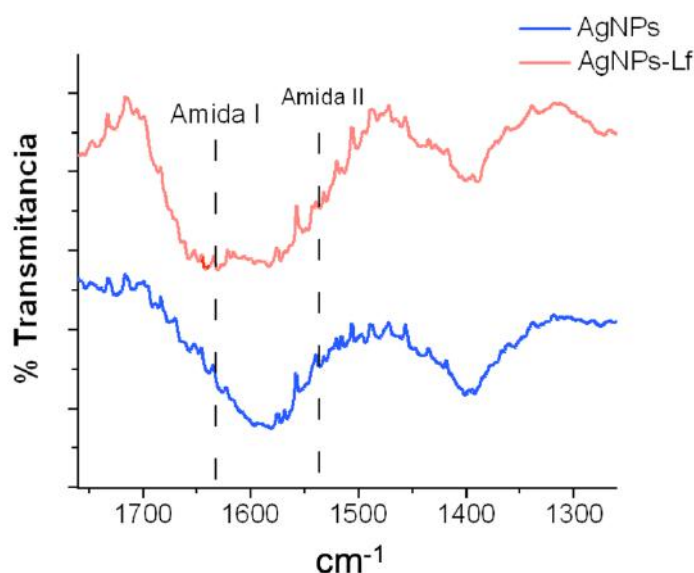


Figura 5.8: Espectros FTIR-ATR de AgNPs y AgNPs-Lf, donde se señalan las bandas típicas de amida I y II presentes en la proteína.

Se estimó la cantidad de proteína adsorbida sobre las AgNPs mediante tinción de Bradford por diferencia de concentración entre la solución de Lf utilizada para funcionalizar las nanopartículas (*Lf i*) y la correspondiente al sobrenadante post funcionalización (*Lf sbn*), según la ecuación 5.1, encontrándose que el  $44,6 \pm 4,8$  % desaparece de la solución luego de la interacción con las nanopartículas en las condiciones estudiadas en este trabajo.

$$\frac{Lf_i - Lf_{sbn}}{Lf_i} \times 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

Adicionalmente se determinó la cantidad de plata total (como concentración de  $\text{Ag}^+$ ) en la dispersión AgNPs-Lf y se comparó con sus equivalentes sin funcionalizar, obteniéndose valores de  $15 \pm 1$   $\mu\text{g/mL}$  para las AgNPs-Lf y  $14 \pm 2$   $\mu\text{g/mL}$  para las AgNPs, indicando que el agregado de Lf a la dispersión de AgNPs no altera el contenido de Ag total.

Por otro lado, de la misma forma que se hiciera con las AgNPs, se estudió la estabilidad de las AgNPs-Lf a pH 4, 7 y 10 a través de espectroscopía UV-visible (figura 5.9). La banda SPR correspondiente a pH = 4 y pH = 10 se desplaza hacia longitudes de onda menores que la medida a pH = 7; asimismo, se observa una disminución de la intensidad de la señal. Estos cambios podrían estar relacionados con cierta degradación de la estructura cuaternaria de la Lf, la que se produce a pH fuertemente ácido o fuertemente alcalino [40]. A pesar de estas modificaciones observadas en la señal SPR, las AgNPs-Lf parecen ser más estables ante cambios de pH que las AgNPs citratadas (Capítulo 4, sección 4.3).

En este sentido, se han reportado estudios sobre la estabilidad de AgNPs recubiertas con diferentes moléculas orgánicas en medios biológicos o frente a cambios de pH. Por ejemplo, el recubrimiento utilizando gelatina o ciertas proteínas como la seroalbúmina bovina aumentan la estabilidad de las AgNPs [42]–[44]. Estas moléculas actúan como una capa protectora a concentraciones bajas e intermedias de ácido, formando una especie de “barrera” amortiguadora del ataque de  $\text{H}^+$  a las nanopartículas. Si la capa de proteína se rompe, el efecto del ácido es inmediato y ocurre la disolución y aglomeración de las mismas [42]. En el caso de las AgNPs recubiertas con gelatina, se encontró que éstas son estables en un amplio rango de pH [43].

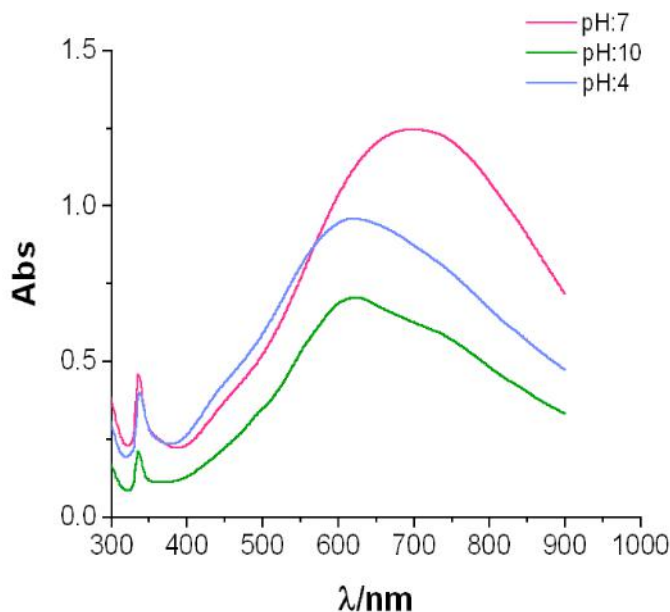


Figura 5.9: Espectros UV-visible de AgNPs-Lf a distinto pH.

### 5.3 Capacidad antimicrobiana de AgNPs-Lf

Una vez caracterizadas las AgNPs-Lf, se procedió a evaluar las propiedades antimicrobianas de las mismas, comparándolas con la proteína en solución y con las AgNPs sin funcionalizar. Para esto, en una primera etapa se evaluó a través de espectroscopía UV-vis la estabilidad de las diferentes AgNPs en el medio de cultivo bacteriano a utilizar. Se determinó que las nanopartículas en ambas dispersiones se agregaban luego de una hora suspendidas en caldo nutritivo sin diluir. Por lo tanto, se empleó para los ensayos antimicrobianos un medio sintético (GMP, Capítulo 3, sección 3.4.1), que permite mantener el cultivo viable durante el tiempo del ensayo y en el que las dispersiones de nanopartículas no sufren alteraciones.

Se realizaron ensayos en placa *multiwell* que consistieron en incubar iguales volúmenes de un cultivo de *S. aureus* ( $10^7$  UFC/mL) con diluciones seriadas (1/4, 1/8 y 1/16) de cada tipo de nanopartículas. Luego de 24 h a 37°C se realizó el recuento en placa de bacterias viables para cada condición. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.10, donde se observa que no hay efecto sinérgico al inmovilizar la proteína en las AgNPs. Por el contrario, la acción antimicrobiana en AgNPs-Lf es menor que la obtenida para las AgNPs sin funcionalizar de la misma concentración.

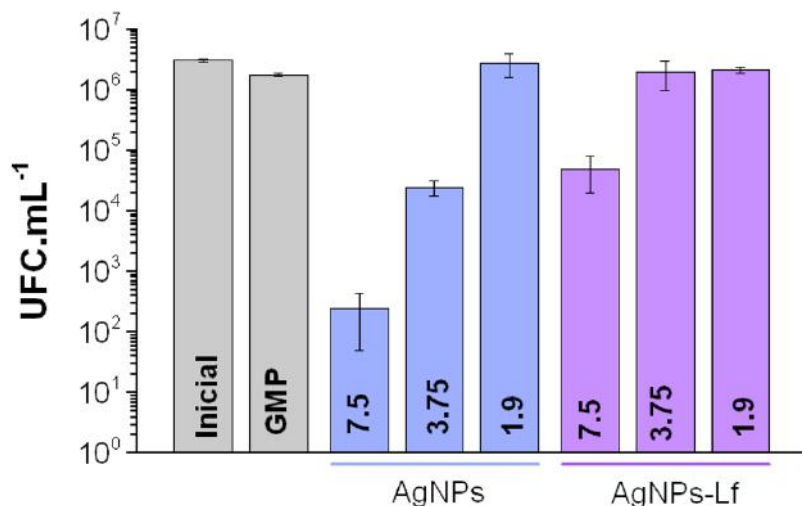


Figura 5.10: Recuento de bacterias planctónicas viables luego de 24 h en contacto con AgNPs y AgNPs-Lf a diferentes concentraciones (expresadas en µg/mL de Ag). Se muestra además el número de bacterias iniciales y el control de crecimiento en GMP.

En este punto es importante mencionar que la metodología desarrollada para la modificación de las AgNPs con Lf resultó tener una baja reproducibilidad, siendo necesarios varios intentos para obtener las dispersiones de AgNPs-Lf. Este hecho, sumado a que no se evidenció un mejor desempeño microbicida de estas nanopartículas respecto a aquellas sin Lf, condujo a desestimar este sistema y orientar el estudio a los que se detallan en las próximas secciones.

#### 5.4 Funcionalización de Ti/TiO<sub>2</sub> con Lactoferrina y AgNPs

Se estudiaron los siguientes sistemas: (i) sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con lactoferrina (Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf); (ii) sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados primero con AgNPs azules y luego con lactoferrina (Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf). Como muestra la figura 5.11, las superficies Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf se obtuvieron depositando una gota de una solución 1 mg/mL de Lf en PBS sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>, los que se mantuvieron en heladera durante 24 h, luego se enjuagaron con agua ultrapura y se dejaron secar al aire. Las muestras Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf se prepararon de la misma manera, utilizando para la deposición de la solución de Lf un sustrato previamente modificado con AgNPs azules siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 4, sección 4.5.1.

Las muestras se caracterizaron mediante AFM, XPS y medida del ángulo de contacto.

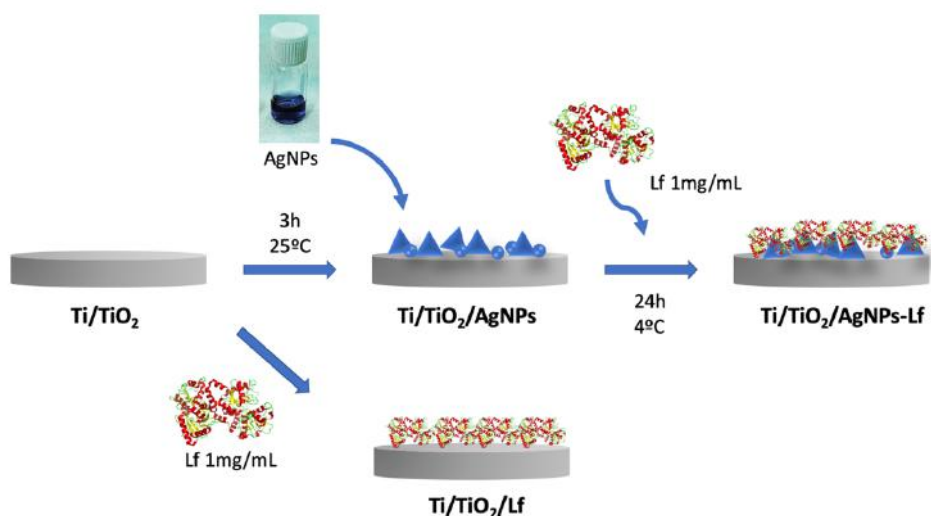


Figura 5.11: Esquema de funcionalización de sustratos de titanio con Lf y AgNPs.

Como se describió en la introducción de este trabajo, el titanio se recubre de una capa de óxido en solución acuosa, quedando expuestos grupos hidroxilos negativos, tornando a la superficie más hidrofílica y favoreciendo así la adsorción de proteínas. Trabajos anteriores comprueban a adsorción espontánea de Lf al titanio [27], [47]. Para evidenciar la presencia de la Lf y AgNPs sobre los sustratos, se analizaron mediante XPS las señales correspondientes a C1s, N1s, S2p y Ag3d. Como puede verse en la tabla 5.1 correspondiente a los resultados de XPS, se observa la reducción de la señal correspondiente a Ti en los sustratos modificados respecto de  $\text{Ti/TiO}_2$  sin modificar. Asimismo, en los sustratos con Lf se advierte un aumento del % de N, O y C y sólo se encuentra la señal de S (proveniente de la proteína) en los sustratos  $\text{Ti/TiO}_2/\text{Lf}$  y  $\text{Ti/TiO}_2/\text{AgNPs/Lf}$ . Las señales de plata fueron detectadas solamente en las muestras con AgNPs. Estos resultados revelan la presencia de Lf en la superficie

Tabla 5.1: Composición superficial de los distintos sustratos obtenida por análisis XPS.

	C (%)	N (%)	O (%)	S (%)	Ti (%)	Ag(%)
<b>Ti/TiO<sub>2</sub></b>	40.72	1.80	45.53	ND	11.31	ND
<b>Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf</b>	67.00	10.92	21.05	0.36	0.62	ND
<b>Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs-Lf</b>	66.29	8.16	23.50	0.38	1.61	0,5

La señal de N1s de los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf (figura 5.12 A y 5.13 A, respectivamente) muestra 3 componentes a  $\approx 399,7$  eV, 400 eV y  $\approx 402$  eV, respectivamente, las que se atribuyen a N-(C=O)-, C-NH<sub>2</sub>, [48], (característicos de compuestos orgánicos como proteínas) y NH<sub>3</sub><sup>+</sup> [49], respectivamente.

Asimismo, la deconvolución de la señal de C1s en Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf conduce a los picos característicos de la proteína a 285,3 eV, 286,8 eV, 287,6 eV y 289 eV asignados a C-H/C-C; C-NH; HN-C=O y C=OO, respectivamente [50] (figura 5.13 B). Para los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf, se observa, además, una contribución a 287,3 eV que se corresponde con grupos C=O libres de los residuos aminoácidos (figura 5.12 B).

La posición del pico de S2p en los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf, se localizó en 164,5 eV, correspondiente a la especie C-SS-C [51], presente en la estructura primaria de la proteína. En este último caso, no se observó la señal del enlace covalente tiolato (Ag-S) reportada en la bibliografía a 161 eV [32] (figura 5.13 D), indicando que no estaría presente este tipo de unión entre la proteína y las AgNPs. Por lo tanto, se puede suponer que la adsorción de la Lf se efectúa a través de a carga negativa superficial de las AgNPs y del Ti/TiO<sub>2</sub>, que interactúan electrostáticamente con la proteína positiva, o bien a través de unión del COO<sup>-</sup> del citrato que recubre las AgNPs con grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de la proteína. En este sentido, existen datos bibliográficos que reportan una interacción electrostática dominante en la adsorción de Lf sobre titanio en condiciones de pH fisiológico [52].

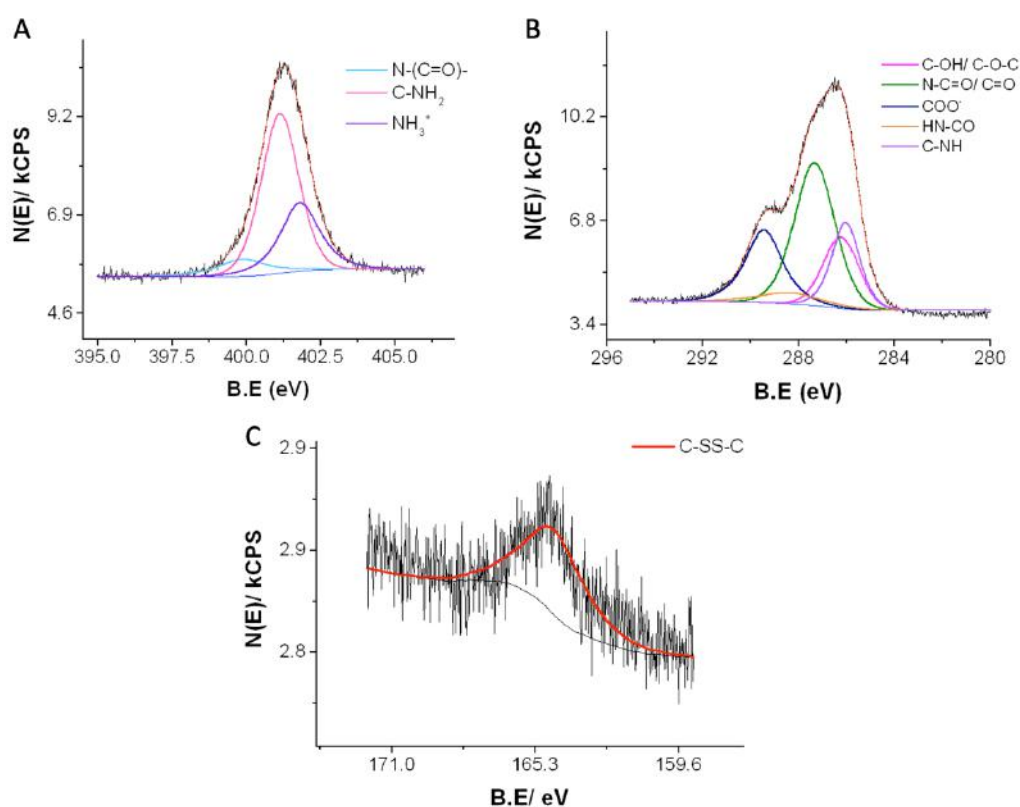


Figura 5.12: Deconvolución de los picos A) N1s, B) C1s, y C) S2p, sobre los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf.

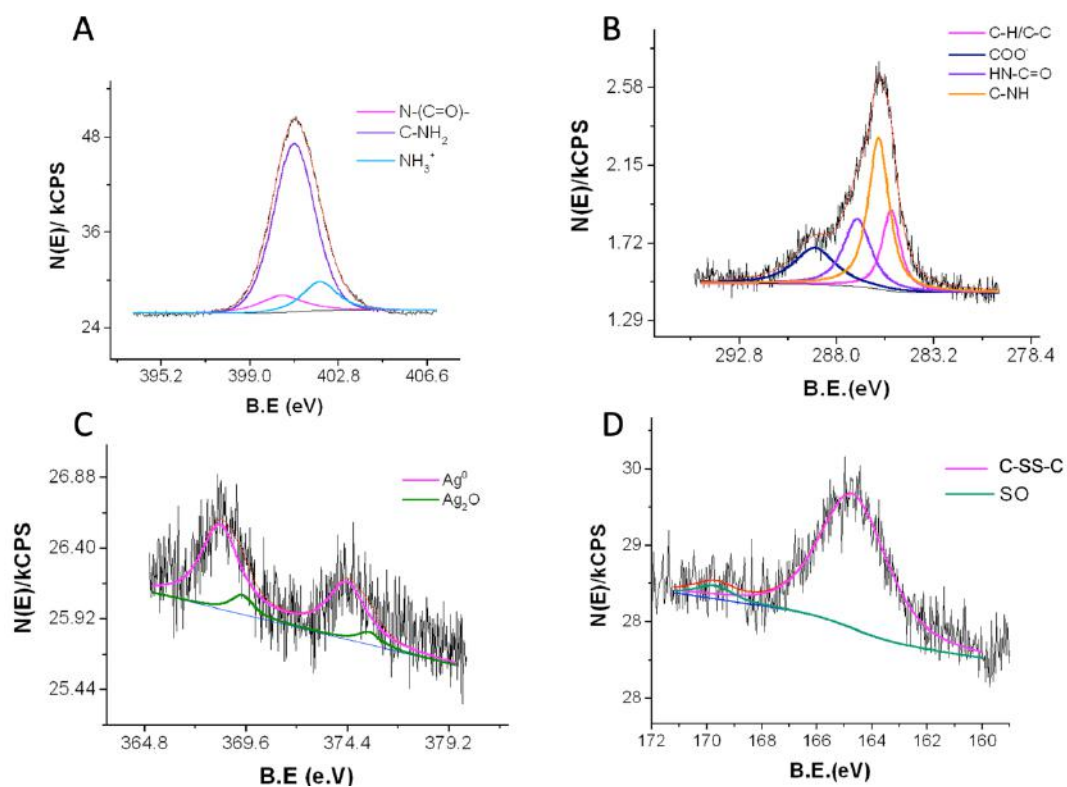


Figura 5.13: Deconvolución de los picos de A) N1s, B) C 1s, C) Ag 3d, y D) S2p, sobre los sustratos funcionalizados Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf

Por último, en Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf se localizaron los picos Ag3d, cuyos dobletes centrados en 368,3 eV y 369,3 eV se corresponde con Ag<sup>0</sup> y en menor proporción de Ag<sub>2</sub>O [53] (figura 5.13 C).

La morfología de las superficies se estudió con microscopía AFM en modo *tapping*. Como puede verse en la figura 5.14 B, la proteína se adsorbe sobre el titanio de forma individual y no cubre la superficie; del mismo modo lo hacen las AgNPs (figura 5.14 C). En la figura 5.14 D pueden distinguirse tanto AgNPs triangulares como Lf sobre la superficie. Las secciones transversales marcadas en rojo y en verde, respectivamente, muestran los tamaños acordes a lo obtenido por DLS para ambas, Lf y AgNPs.

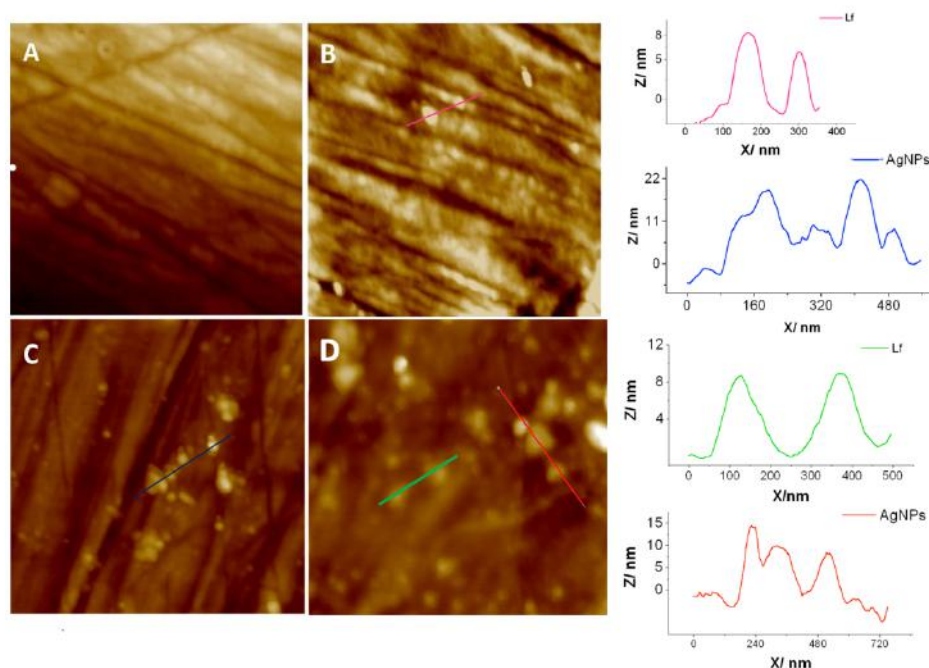


Figura 5.14: imágenes de AFM (2x2μm<sup>2</sup>) de los sustratos. A: Ti/TiO<sub>2</sub>, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs, D: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf. Se muestran las secciones transversales de cada figura con su respectivo color.

El análisis del ángulo de contacto (CA) en superficies biocompatibles permite evaluar la probabilidad de adhesión celular, como los fibroblastos u osteoblastos, y, por lo tanto, de crecimiento de tejido biológico. Algunos dispositivos permanentes necesitan fijarse fuertemente al tejido para cumplir su función mecánica y biológica [54], y con este



propósito, son preferibles los materiales que tengan superficies hidrofílicas. Se analizaron las propiedades de mojado de los sustratos (Tabla 5.2). La reducción de los valores de CA en presencia de Lf es consistente con un aumento de la hidrofiliidad superficial. Este comportamiento ha sido observado por Godoy-Gallardo *et al.* al inmovilizar un péptido derivado de Lf sobre superficies de Ti silanizadas [45]. Adicionalmente, la superficie multifuncionalizada resultó ser la más hidrofílica, en concordancia con Torrisi *et. al.* [54], [55] quienes encontraron que la incorporación de nanopartículas de oro o plata a un sustrato de titanio mediante *drop-casting* torna a la superficie más hidrofílica.

Tabla 5.2: Ángulo de contacto medido para las distintas superficies.

Ti/TiO <sub>2</sub>	Ti/TiO <sub>2</sub> /AgNps	Ti/TiO <sub>2</sub> /Lf	Ti/TiO <sub>2</sub> /AgNps/Lf
69,3 ± 4,7	57,8 ± 1,5	45,8 ± 2,8	24,9 ± 1,6

#### 5.4.1 Estudios de las propiedades antimicrobianas

Para realizar los ensayos antimicrobianos se procedió según lo descrito en el Capítulo 3, sección 3.2, utilizando como cepa bacteriana *S. aureus*. Se analizaron las bacterias viables sobre los sustratos luego de 2 h de incubación en el medio de cultivo (bacterias adheridas iniciales, denotadas como sust t=0) y luego de 24 h en medio GMP (denotadas como sust t=24). Los resultados se muestran en la figura 5.15, en la que puede observarse que los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf son capaces de inhibir la adhesión bacteriana en relación al control Ti/TiO<sub>2</sub>. Particularmente, para Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf, el crecimiento bacteriano es inhibido en un 98,3% luego de 24 h de incubación, tanto respecto de las bacterias inicialmente adheridas al control como en relación a las encontradas sobre Ti/TiO<sub>2</sub> luego de 24 h (control de crecimiento). Lo mismo sucede en el caso de Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf, en el que se encontró un 97,7% de inhibición respecto de las bacterias iniciales y un 96,2% respecto del control de crecimiento. La interacción entre la proteína y las bacterias es compleja [56] y al anclarse sobre una superficie se pueden limitar algunos mecanismos de acción antimicrobiana, derivando en propiedades bacteriostáticas de la superficie modificada.

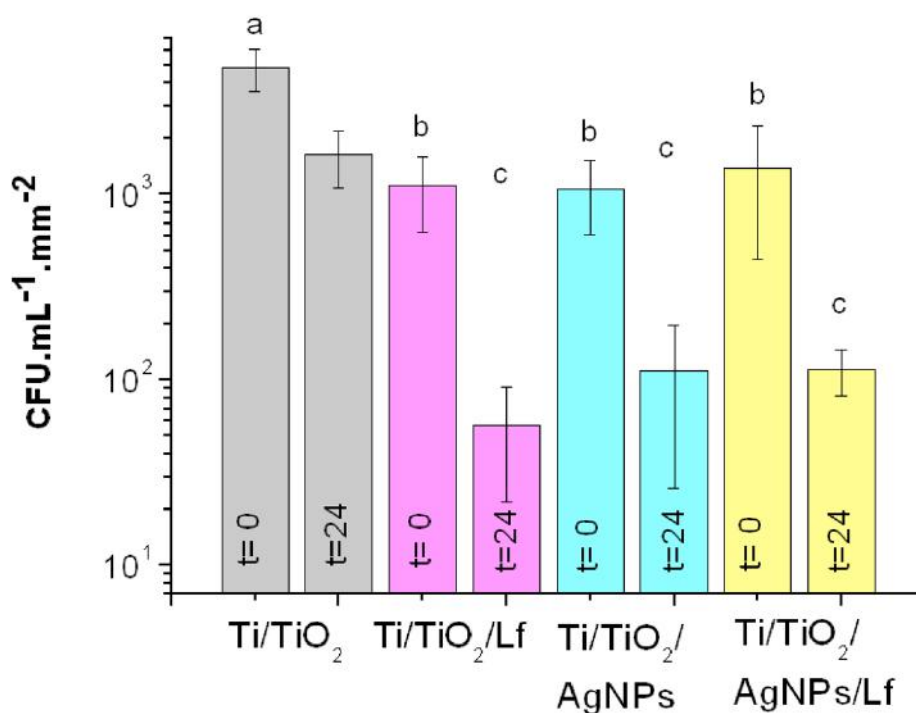


Figura 5.15: Bacterias sésiles viables luego de 2 h (t=0) y 24 h a 37°C para cada sustrato. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto del control a t=0.

#### 5.4.2 Estudios de la biocompatibilidad de los materiales

Para analizar la biocompatibilidad de las muestras, se estudió la adhesión de macrófagos y de células pre-osteoblásticas (MC3T3-E1) siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3, sección 3.4.3. En la figura 5.16 se muestran imágenes de microscopía de epifluorescencia obtenidas mediante la tinción con naranja de acridina de las células adheridas. Puede observarse que sobre Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs la adhesión de células MC3T3-E1 es similar a Ti/TiO<sub>2</sub>. Por otro lado, se encontró una mayor densidad de células en la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf, donde incluso pueden notarse zonas de confluencia celular (flechas blancas), lo que indica una buena interacción entre la superficie y las células. Concretamente, el incremento en el número de células adheridas es de 80% respecto de Ti/TiO<sub>2</sub>, Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs y Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf.

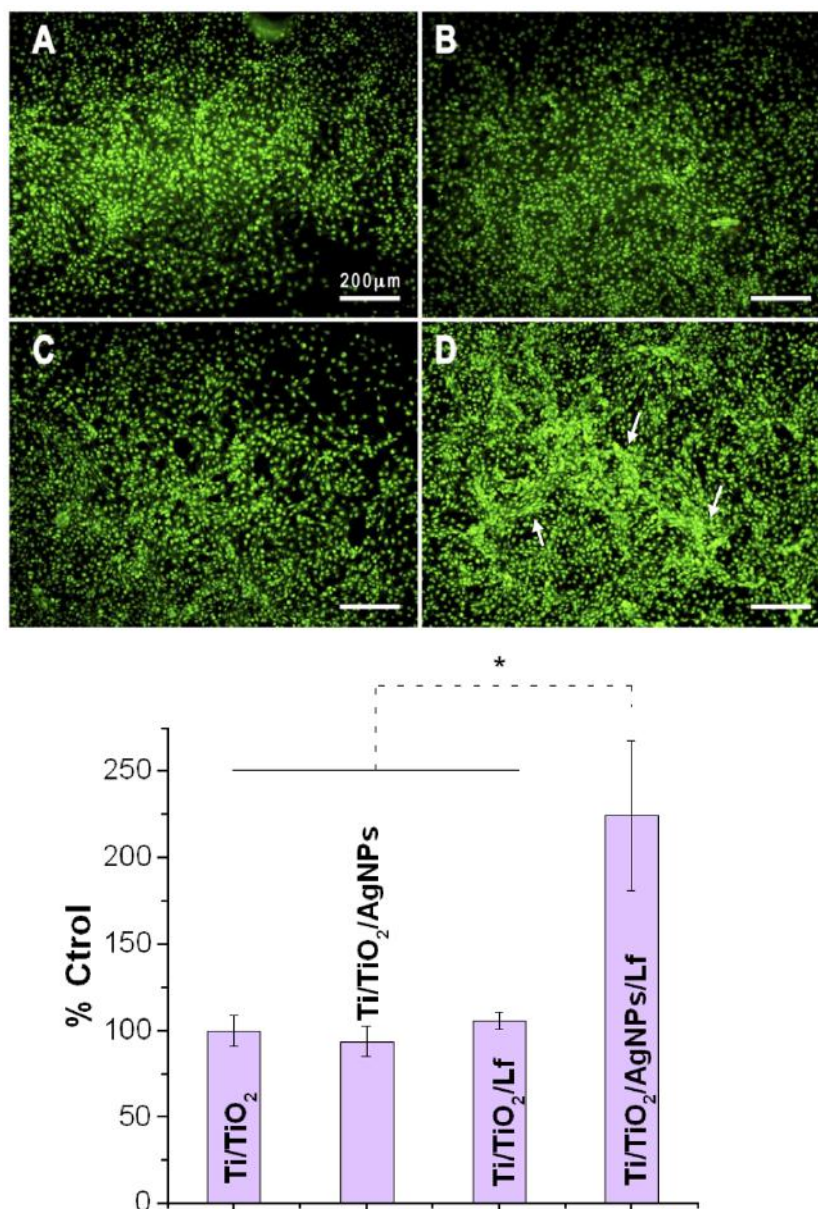


Figura 5.16: Superior: imágenes de células MC3T3-E1 adheridas sobre cada superficie luego de 24 h de incubación en el medio conteniendo células. A: Ti/TiO<sub>2</sub>, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs-Lf. Inferior: % de adhesión respecto del control (Ti sin modificar).

Para evaluar la viabilidad de las células adheridas se utilizó el kit de LIVE/DEAD® de Invitrogen, que permite distinguir las células metabólicamente activas de las inactivas (Capítulo 3, sección 3.4.4). Se contaron las células viables en cada sustrato luego de 24 h y se calculó el % de células vivas respecto del total sobre cada

sustrato. Como control negativo se empleó Ti/TiO<sub>2</sub> con células previamente tratadas por 15 min con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los valores obtenidos indican que no hay disminución en la viabilidad celular (figura 5.17), por lo que ninguna de las superficies resultaron ser citotóxicas en las condiciones ensayadas. La biocompatibilidad de la Lf es bien conocida, ya sea incluida en compositos [57] como inmovilizada sobre superficies de distinta naturaleza [58], [59]. En particular, Kim *et al.* estudiaron la adhesión y proliferación de células MG-63 sobre titanio conteniendo una capa de heparina - dopamina conjugadas sobre la que se depositaron diferentes cantidades de Lf, encontrando que la proliferación celular aumenta con el tiempo, sin diferencias significativas entre titanio sin tratar y las muestras tratadas. Diferente es la situación en el caso de las AgNPs, para las que se ha encontrado que la citotoxicidad, genotoxicidad y biocompatibilidad dependen de muchos factores, como el tamaño, la forma, la carga superficial, el recubrimiento superficial, la solubilidad, la concentración, la funcionalización de la superficie, la distribución de partículas, el medio de crecimiento, el tiempo de exposición y tipo de célula, entre otros. Las respuestas celulares a las AgNPs son diferentes en cada tipo de célula y dependen de su naturaleza física y química [60]. Cabe destacar que la mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo mediante la adición de diferentes dosis de nanopartículas en dispersión a diferentes cultivos celulares, encontrándose que la citotoxicidad es baja o nula para concentraciones pequeñas de nanopartículas [61], por lo que existe una ventana de concentraciones en la que las AgNPs tienen efecto antimicrobiano sin producir daño celular. Por otro lado, poco se ha reportado acerca de la citotoxicidad de AgNPs ancladas en superficies. Nuestros resultados indican que la concentración superficial de AgNPs es suficiente para producir la disminución de la viabilidad bacteriana pero no tan alta como para disminuir la biocompatibilidad de la superficie.

Por otro lado, cuando se coloca un implante, inmediatamente después del contacto con la sangre, se activa una respuesta del sistema inmune del paciente, en la que los dispositivos son reconocidos como cuerpos extraños y, consecuentemente, pueden ser cubiertos por un tejido granular y fibroso conocido como encapsulamiento. Esta cápsula de tejido dificulta una correcta fijación e integración del implante [62]. Para evaluar la potencial activación de la respuesta inmune se cuantificó el % de macrófagos Raw 264.7 adheridos sobre los distintos sustratos. Se puede apreciar en la figura 5.18 que no se evidencian diferencias significativas respecto del control de titanio, indicando una potencial respuesta inmunológica muy baja o nula.

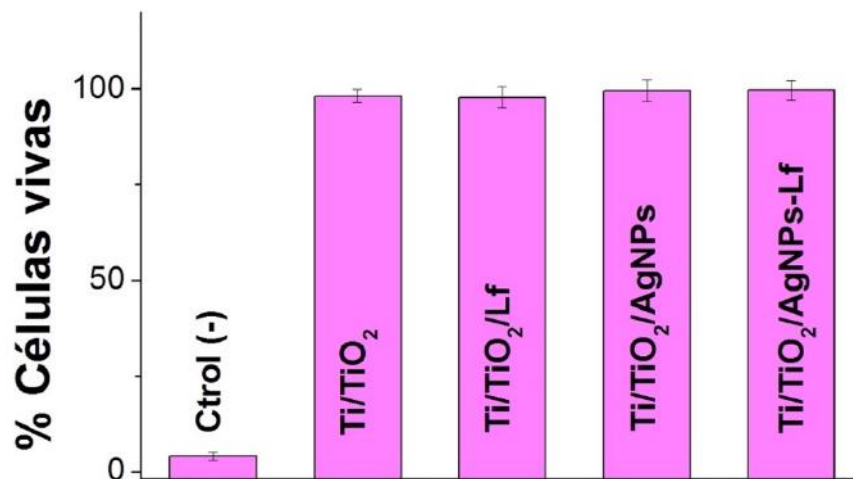


Figura 5.17: % de células viables sobre cada superficie respecto del número total de células en la misma muestra.

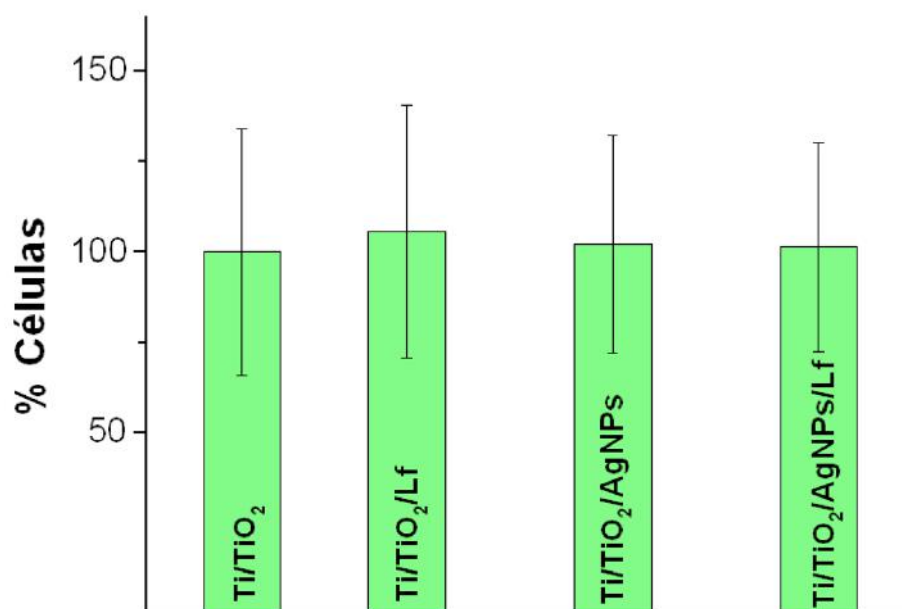


Figura 5.18: adhesión de macrófagos Raw 264.7 luego de 24 h de contacto con las distintas superficies. No hay diferencias significativas entre ellos,  $p < 0,01$

## **5.5 Propiedades osteorregeneradoras de los sustratos de titanio modificados con Lf y AgNPs**

### **5.5.1 Evaluación de colágeno y mineralización de la matriz extracelular**

Se evaluó el grado de mineralización de las células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 crecidas sobre los distintos sustratos durante 15 o 21 días, mediante la evaluación de los niveles de colágeno tipo I y de calcio, respectivamente, determinados colorimétricamente como se indica en el Capítulo 3, sección 3.4.5.2. Estos componentes, a su vez, también son indicadores de la diferenciación tardía de estas células a osteocitos [63]. A mayor cantidad de calcio y colágeno, mayor es el grado de diferenciación. Como se puede apreciar en la figura 5.19, los sustratos multifuncionalizados con AgNPs y Lf presentaron niveles de colágeno significativamente mayores que el resto. Esta misma tendencia se encontró en la cantidad de calcio secretado sobre cada uno de los sustratos (figura 5.20). Se han reportado varios estudios de superficies modificadas con Lf y otros componente como heparina en donde también observan un incremento en la mineralización y diferenciación de osteoblastos [64]–[66].

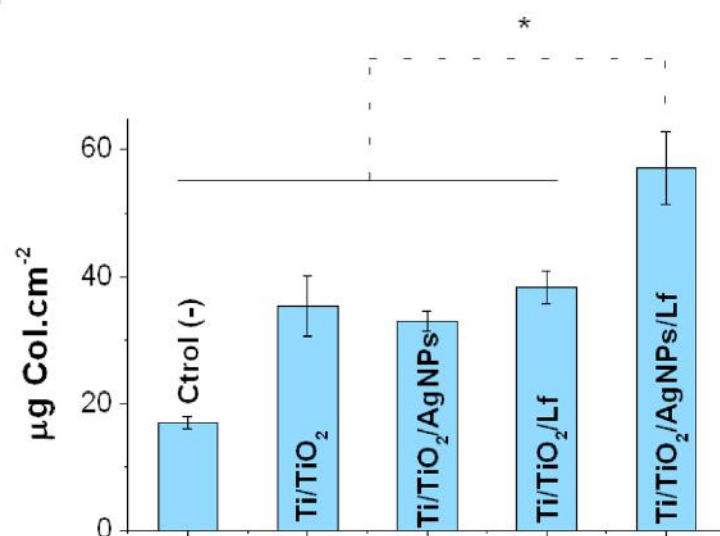


Figura 5.19: Resultados de la determinación de colágeno sintetizado por células pre-osteoblásticas al diferenciarse sobre cada uno de los sustratos. El Ctrl (-) corresponde a un titanio sin funcionalizar al que no se le añadió medio osteogénico. El gráfico corresponde a los valores promedio y la SE del error, analizado con el test de Tukey  $p < 0,05$ .

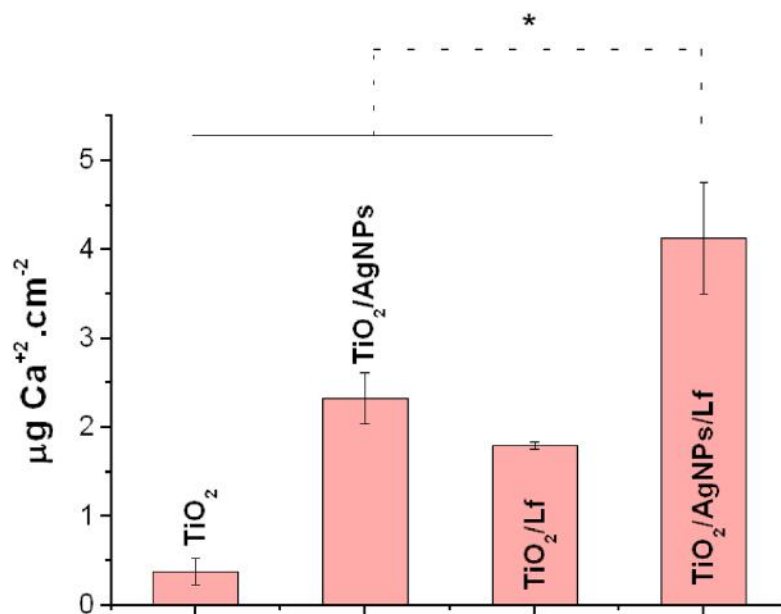


Figura 5.20: Cuantificación de la cantidad de Ca<sup>+2</sup> intracelular sobre los diferentes sustratos. Mayores cantidades se relacionan con mayor diferenciación y síntesis de matriz ósea.

### 5.5.2 Fosfatasa alcalina como marcador de la diferenciación celular.

Se determinó cualitativamente la cantidad de enzima fosfatasa alcalina (FAL) secretada por las células sobre cada sustrato al término de 15 días, mediante imágenes de fluorescencia. Luego, se calculó el % de área teñida para cada sustrato a través del software ImageJ. Los resultados se muestran en la tabla 5.3. Los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf expresaron en mayor cantidad la enzima, mientras que para Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf fue ligeramente menor. Todos los sustratos modificados aumentaron la expresión de FAL respecto del control sin modificar, pero el titanio multifuncionalizado fue el que resultó más propicio. Finalmente, en la figura 5.21 y 5.22 se muestran imágenes representativas de las utilizadas para los cálculos. Nótese que en la figura 5.22 se muestran los núcleos celulares teñidos con el colorante Hoechst (azul), rodeados de la matriz conteniendo FAL en color rojo.

Tabla 5.3: % de área teñida para cada sustrato luego de 15 días con medio osteogénico.

Sustrato	Ti/TiO <sub>2</sub>	Ti/TiO <sub>2</sub> /AgNPs	Ti/ TiO <sub>2</sub> /Lf	Ti/ TiO <sub>2</sub> / AgNPs/Lf
% Área teñida	26,4 ± 3,1	43,2 ± 2,0	32,6 ± 6,2	48,5 ± 4,1

Los sustratos multifuncionalizados con AgNPs y Lf resultaron ser biocompatibles, y al mismo tiempo estimulantes de la diferenciación de los osteoblastos y la formación de la matriz ósea necesaria para una buena fijación del implante. Estos resultados son consistentes con otros trabajos en los que se concluye que aquellos materiales que contienen a la proteína se comportan como promotores de la diferenciación de osteoblastos, expresada principalmente por el aumento en la enzima FAL, de los niveles de calcio y de otras proteínas como la osteocalcina [64], [66]–[69].



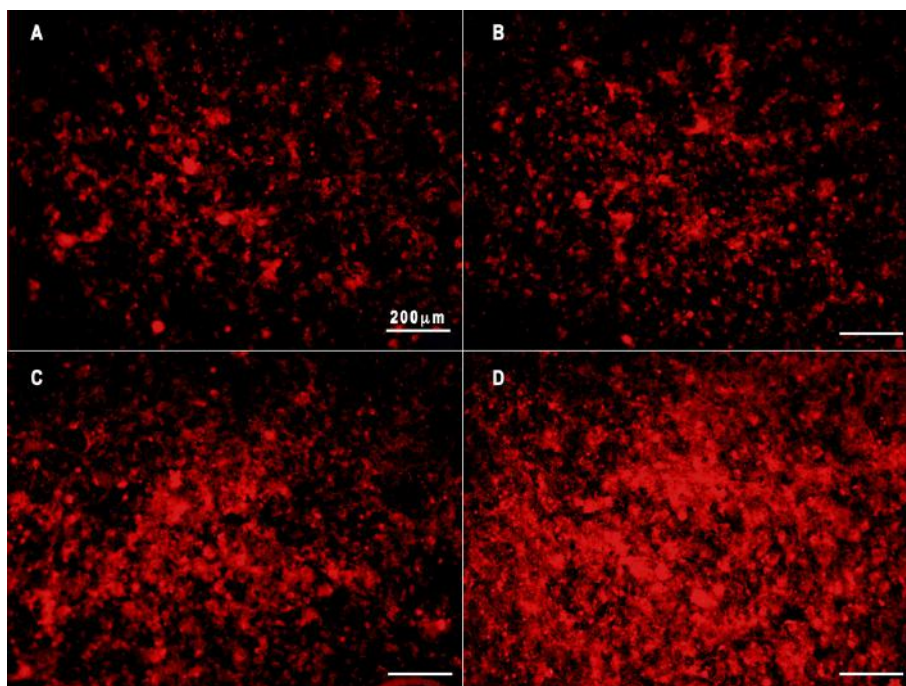


Figura 5.21: imágenes de epifluorescencia de la enzima fosfatasa alcalina sintetizada por células sobre los diferentes sustratos. Esta enzima se utiliza como marcador de diferenciación a osteoblastos. A: Titanio control, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf.

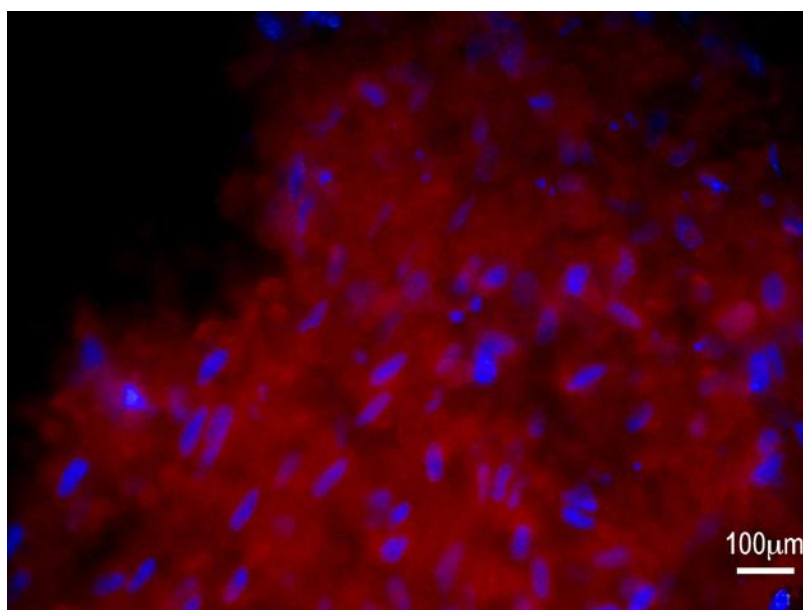


Figura 5.22: Imagen superpuesta de tinción con Hoechst (núcleos azules) y tinción con el kit para FAL (rojo)

## 5.6 Conclusiones

Se logró funcionalizar con la proteína de forma directa las AgNPs azules, obteniéndose una dispersión medianamente estable frente a cambios de pHs y estables a pH neutro, pudiendo ser mantenidas en dispersión acuosa durante varias semanas.

Las AgNPs funcionalizadas de esta forma poseen un efecto antimicrobiano similar a las AgNPs sin modificar frente a bacterias planctónicas, sin evidenciarse efectos sinérgicos de los agentes. Por otra parte, al no poder controlar los parámetros que afectan al mecanismo de funcionalización de las AgNPs con Lf, no se consiguió una síntesis fácilmente reproducible.

Se prepararon exitosamente superficies multi-componente a partir de una doble funcionalización, es decir, primero se adsorben las AgNPs y luego la proteína. Estos sustratos sí presentaron una actividad antimicrobiana aceptable, similar a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado solo con AgNPs y una excelente biocompatibilidad, superior a la de los sustratos sin Lf, demostrada a través de altos niveles de adhesión y viabilidad de células eucariotas. Fundamentalmente, estas superficies multi-componente mostraron la mayor capacidad osteorregeneradora, medida en términos de la mineralización y diferenciación celular.

## 5.6 Bibliografía

- [1] S. Kurtz, K. Ong, E. Lau, F. Mowat, and M. Halpern, "Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030," *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 89, no. 4, pp. 780–785, Apr. 2007.
- [2] J. Raphel, M. Holodniy, S. B. Goodman, and S. C. Heilshorn, "Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants," *Biomaterials*, vol. 84. NIH Public Access, pp. 301–314, Apr-2016.
- [3] L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, and Z. Wu, "Antibacterial coatings on titanium implants," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 91, no. 1, pp. 470–480, 2009.
- [4] L. Danišovič, I. Varga, and Š. Polák, "Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Tissue Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 69–73, Apr. 2012.
- [5] H. C. Blair *et al.*, "Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, vol. 23, no. 3, pp. 268–280, Jun-2017.
- [6] R. Fujisawa, "Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification," *Front. Biosci.*, vol. 17, no. 1, p. 1891, 2012.
- [7] W. J. Landis, "Mineral Characterization in Calcifying Tissues: Atomic, Molecular and Macromolecular Perspectives," *Connect. Tissue Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 239–246, Jan. 1996.
- [8] A. Veis and J. R. Dorvee, "Biom mineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices.," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 93, no. 4, pp. 307–15, Oct. 2013.
- [9] P. H. Chua, K. G. Neoh, E. T. Kang, and W. Wang, "Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion," *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1412–1421, 2008.
- [10] K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, and T. A. Desai, "Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes," *Biomaterials*, vol. 28, no. 32, pp. 4880–4888, 2007.
- [11] L. Zhao *et al.*, "Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 24, pp. 5706–5716, 2011.
- [12] T. Kumeria *et al.*, "Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 130, pp. 255–263, 2015.
- [13] T. Li, N. Wang, S. Chen, R. Lu, H. Li, and Z. Zhang, "Antibacterial activity and

- cytocompatibility of an implant coating consisting of TiO<sub>2</sub> nanotubes combined with a GL13K antimicrobial peptide,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 12, pp. 2995–3007, Apr. 2017.
- [14] N. Duewelhenke, O. Krut, and P. Eysel, “Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 1, pp. 54–63, 2007.
  - [15] T. E. Rams, J. E. Degener, and A. J. Van Winkelhoff, “Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 82–90, 2014.
  - [16] Ana Maria Lora Sanchez, “Identificación y cuantificación de dos proteínas con propiedades antimicrobianas en suero lácteo,” Universidad Autónoma de Querétaro, 2007.
  - [17] M. Murata, H. Wakabayashi, K. Yamauchi, and F. Abe, “Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin,” *J. Dairy Sci.*, vol. 96, no. 8, pp. 4891–8, 2013.
  - [18] D. A. Rodríguez-Franco, L. Vázquez-Moreno, and G. Ramos-Clamont Montfort, “Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales,” *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 3–4, pp. 102–111, 2005.
  - [19] T. F. Byrd and M. A. Horwitz, “Lactoferrin inhibits or promotes legionella pneumophila intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation: Iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against legionella pneumophila,” *J. Clin. Invest.*, vol. 88, no. 4, pp. 1103–1112, 1991.
  - [20] S. A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, and Q. Rascón-Cruz, “Lactoferrin: structure, function and applications,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 33, no. 4, 2009.
  - [21] A. A. Amini and L. S. Nair, “Lactoferrin: a biologically active molecule for bone regeneration,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 8, pp. 1220–1229, 2011.
  - [22] N. O’Riordan, M. Kane, L. Joshi, and R. M. Hickey, “Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation,” *Glycobiology*, vol. 24, no. 3, pp. 220–236, 2014.
  - [23] M. C. B. Ammons, L. S. Ward, S. Dowd, and G. A. James, “Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 37, no. 4, pp. 316–323, Apr. 2011.
  - [24] R. T. Ellison and T. J. Giehl, “Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme,” *J. Clin. Invest.*, vol. 88, no. 4, pp. 1080–91, Oct. 1991.
  - [25] R. T. 3rd Ellison, T. J. Giehl, and F. M. LaForce, “Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin,” *Infect. Immun.*,

- vol. 56, no. 11, pp. 2774–2781, Nov. 1988.
- [26] P. Valenti and G. Antonini, “Lactoferrin,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 22, pp. 2576–2587, Nov. 2005.
  - [27] M. Godoy-Gallardo *et al.*, “Antibacterial properties of hLf1-11 peptide onto titanium surfaces: a comparison study between silanization and surface initiated polymerization.,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 2, pp. 483–96, Feb. 2015.
  - [28] Y. Xu *et al.*, “Lactoferrin-coated polysaccharide nanoparticles based on chitosan hydrochloride/hyaluronic acid/PEG for treating brain glioma,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 419–428, Feb. 2017.
  - [29] D. M. Kabary, M. W. Helmy, K. A. Elkhodairy, J. Y. Fang, and A. O. Elzoghby, “Hyaluronate/lactoferrin layer-by-layer-coated lipid nanocarriers for targeted co-delivery of rapamycin and berberine to lung carcinoma,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 183–194, Sep. 2018.
  - [30] R. Drago Serrano, M. Elisa; Flores Romo, Leopoldo; Oliver Aguillon, Gabriela; Jarillo Luna, Rosa A; Reina Garfias, Humberto; Barbosa Cabrera Elizabeth; Campos Rodriguez, “La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria,” *Bioquímica*, vol. 33, no. 2, pp. 71–82, 2008.
  - [31] P. S. Nayak *et al.*, “Lactoferrin adsorption onto silver nanoparticle interface: Implications of corona on protein conformation, nanoparticle cytotoxicity and the formulation adjuvanticity,” *Chem. Eng. J.*, vol. 361, pp. 470–484, Apr. 2019.
  - [32] D. E. Pissinis, G. A. Benítez, and P. L. Schilardi, “Two-step biocompatible surface functionalization for two-pathway antimicrobial action against Gram-positive bacteria,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 164, pp. 262–271, Apr. 2018.
  - [33] H. García and R. Vázquez, “Cuantificación De Proteínas: Una Revisión,” in *Bio Tecnología*, vol. 3, 1998, pp. 78–87.
  - [34] C. Noguez, “Optical properties of isolated and supported metal nanoparticles,” in *Optical Materials*, 2005, vol. 27, no. 7, pp. 1204–1211.
  - [35] J. Doak, R. K. Gupta, K. Manivannan, K. Ghosh, and P. K. Kahol, “Effect of particle size distributions on absorbance spectra of gold nanoparticles,” *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures*, vol. 42, no. 5, pp. 1605–1609, Mar. 2010.
  - [36] K. Ock *et al.*, “Real-time monitoring of glutathione-triggered thiopurine anticancer drug release in live cells investigated by surface-enhanced raman scattering,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 5, pp. 2172–2178, 2012.
  - [37] S. Goy-López *et al.*, “Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates: The role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition,” *Langmuir*, vol. 28, no. 24, pp. 9113–9126, Jun. 2012.
  - [38] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, and V. Puntès, “Time evolution of the nanoparticle protein corona,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 7, pp. 3623–3632, Jul. 2010.

- [39] R. Huang, R. P. Carney, F. Stellacci, and B. L. T. Lau, "Protein–nanoparticle interactions: The effects of surface compositional and structural heterogeneity are scale dependent," *Nanoscale*, vol. 5, no. 15, pp. 6928–6935, Jul. 2013.
- [40] P. Pomastowski *et al.*, "Silver-Lactoferrin Nanocomplexes as a Potent Antimicrobial Agent," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 25, pp. 7899–7909, Jun. 2016.
- [41] S. Kumari and A. K. Kondapi, "Lactoferrin nanoparticle mediated targeted delivery of 5-fluorouracil for enhanced therapeutic efficacy," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 232–237, Feb. 2017.
- [42] M. N. Martin, A. J. Allen, R. I. Maccuspie, and V. A. Hackley, "Dissolution, agglomerate morphology, and stability limits of protein-coated silver nanoparticles," *Langmuir*, vol. 30, no. 38, pp. 11442–11452, Sep. 2014.
- [43] M. Sivera *et al.*, "Silver Nanoparticles Modified by Gelatin with Extraordinary pH Stability and Long-Term Antibacterial Activity," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e103675, Aug. 2014.
- [44] R. I. MacCuspie, "Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 7, pp. 2893–2908, Jul. 2011.
- [45] H. Jenssen and R. E. W. Hancock, "Antimicrobial properties of lactoferrin," in *Biochimie*, vol. 91, no. 1, Elsevier Masson, 2009, pp. 19–29.
- [46] E. D. Weinberg, "Antibiotic properties and applications of lactoferrin.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 13, no. 8, pp. 801–811, 2007.
- [47] E. Yoshida and T. Hayakawa, "Adsorption study of pellicle proteins to gold, silica and titanium by quartz crystal microbalance method," *Dent. Mater. J.*, vol. 32, no. 6, pp. 883–887, 2013.
- [48] "X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference Pages: Nitrogen," 2019. [Online]. Available: <http://www.xpsfitting.com/search/label/Nitrogen>.
- [49] M. H. Ahmed, J. A. Byrne, J. McLaughlin, and W. Ahmed, "Study of Human Serum Albumin Adsorption and Conformational Change on DLC and Silicon Doped DLC Using XPS and FTIR Spectroscopy," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 04, no. 02, pp. 194–203, 2013.
- [50] E. Stoleru *et al.*, "Lactoferrin-immobilized surfaces onto functionalized PLA assisted by the gamma-rays and nitrogen plasma to create materials with multifunctional properties," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 46, pp. 31902–31915, 2016.
- [51] R. Molina, J. P. Espinós, F. Yubero, P. Erra, and A. R. González-Elípe, "XPS analysis of down stream plasma treated wool: Influence of the nature of the gas on the surface modification of wool," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 252, no. 5, pp. 1417–1429, Dec. 2005.
- [52] E. Yoshida and T. Hayakawa, "Adsorption Analysis of Lactoferrin to Titanium, Stainless Steel, Zirconia, and Polymethyl Methacrylate Using the Quartz Crystal

- Microbalance Method," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1–7, 2016.
- [53] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, "Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver," *Nanoscale*, vol. 5, no. 16, pp. 7328–7340, Jul. 2013.
  - [54] T. Torrisi and S. C, "Nanoparticles Improving the Wetting Ability of Biological Liquids," *J. Thermodyn. Catal.*, vol. 08, no. 02, pp. 1–6, Mar. 2017.
  - [55] M. Godoy-Gallardo *et al.*, "Antibacterial properties of hLf1-11 peptide onto titanium surfaces: A comparison study between silanization and surface initiated polymerization," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 2, pp. 483–496, 2015.
  - [56] J. M. L. Ling and A. B. Schryvers, "Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 84, no. 3, pp. 275–281, Jun. 2006.
  - [57] M. Icriverzi *et al.*, "Human mesenchymal stem cell response to lactoferrin-based composite coatings," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 20, Oct. 2019.
  - [58] C. Constantinescu *et al.*, "Multifunctional thin films of lactoferrin for biochemical use deposited by MAPLE technique," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 10, pp. 5491–5495, Mar. 2009.
  - [59] S. E. Kim, Y.-P. Yun, J. Y. Lee, K. Park, and D. H. Suh, "Osteoblast activity of MG-63 cells is enhanced by growth on a lactoferrin-immobilized titanium substrate," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 123, pp. 191–198, Nov. 2014.
  - [60] X. F. Zhang, W. Shen, and S. Gurunathan, "Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An in vitro model," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 10. MDPI AG, 01-Oct-2016.
  - [61] L. Pauksch *et al.*, "Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 1, pp. 439–449, Jan. 2014.
  - [62] A. Civantos, E. Martínez-Campos, V. Ramos, C. Elvira, A. Gallardo, and A. Abarrategi, "Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 7, pp. 1245–1261, Jul. 2017.
  - [63] A. Note, "Osteoblast Differentiation and Mineralization," *PromoCell*, p. 5.
  - [64] S. E. Kim, Y. P. Yun, J. Y. Lee, K. Park, and D. H. Suh, "Osteoblast activity of MG-63 cells is enhanced by growth on a lactoferrin-immobilized titanium substrate," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 123, pp. 191–198, 2014.
  - [65] S. E. Kim *et al.*, "The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function," *Biomaterials*, vol. 32, no. 2, pp. 366–373, Jan. 2011.
  - [66] M. Montesi, S. Panseri, M. Iafisco, A. Adamiano, and A. Tampieri, "Effect of

- hydroxyapatite nanocrystals functionalized with lactoferrin in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, no. 1, pp. 224–34, Jan. 2015.
- [67] M. Vandrovcova, T. E. L. Douglas, S. Heinemann, D. Scharnweber, P. Dubruel, and L. Bacakova, “Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 2, pp. 525–533, 2015.
- [68] M. Hoyos-Nogués, F. Velasco, M.-P. Ginebra, J. M. Manero, F. J. Gil, and C. Mas-Moruno, “Regenerating bone via multifunctional coatings: The blending of cell integration and bacterial inhibition properties on the surface of biomaterials.,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, p. acsami.7b03127, 2017.
- [69] M. Hoyos-Nogués, J. Buxadera-Palomero, M. P. Ginebra, J. M. Manero, F. J. Gil, and C. Mas-Moruno, “All-in-one trifunctional strategy: A cell adhesive, bacteriostatic and bactericidal coating for titanium implants,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 30–40, Sep. 2018.



# Capítulo 6:

## Adsorción de AgNPs sobre titanio mediada por poli-L-lisina

*"Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico-tecnológico, y los países pobres lo siguen siendo porque no lo hacen. La ciencia no es cara, cara es la ignorancia" Bernardo Houssay*



## 6.1 Introducción

En el Capítulo 4, se describió la adsorción espontánea de AgNPs sobre Ti/TiO<sub>2</sub>, formando aglomerados y dejando grandes zonas del sustrato sin cubrir. Estas superficies resultaron tener actividad antimicrobiana de tipo bacteriostática, debido a la baja concentración superficial de plata disponible. Una estrategia para aumentar el cubrimiento consiste en colocar sobre la superficie una capa de algún agente capaz de interactuar fuertemente con las nanopartículas. Por ejemplo, se han inmovilizado AgNPs sobre titanio modificado con 3-(aminopropil) trietoxisilano [1], sobre silicio modificado con 3-(2-aminoetilaminopropil)- trimetoxi silano (AEAPTMS) [2], o mediante la síntesis de nanopartículas *in situ* en capas ultradelgadas de fosfato de titanio ancladas sobre cuarzo [3] o sobre films mesoporosos conteniendo tiopropiltrimetoxisilanos organofosforados sobre vidrio [4]. En el caso de los dispositivos implantables, esa capa mediadora de la inmovilización de nanopartículas debe ser biocompatible y no exhibir citotoxicidad. Por estos motivos, en este trabajo se eligió la poli-L-lisina (PLL) como mediador de la adsorción de AgNPs.

La poli-L-lisina (PLL) es un polímero orgánico derivado del aminoácido lisina que se utiliza comúnmente como facilitador de la adhesión de células eucariotas sobre superficies, tales como vidrio o plásticos. Es sintetizado de forma natural por algunos microorganismos como *Streptomyces spp*, y ha sido aislado y caracterizado por Shima et al en 1977 [5]. Particularmente, esta molécula tiene un punto isoeléctrico de 9.6, por lo que en condiciones fisiológicas los grupos amino se encuentran protonados, confiriéndole una carga neta positiva (figura 6.1). Esta particularidad es sumamente útil para adsorberla electrostáticamente sobre diferentes superficies negativas como vidrio[6], mica [7], polímeros [8], e incluso óxidos metálicos como aluminio o titanio [9]. Consecuentemente, la carga positiva de las superficies modificadas con PLL presenta un gran interés para este trabajo, ya que permite la adsorción de otras especies que posean carga negativa, tales como las AgNPs recubiertas con citrato utilizadas en este trabajo, las que podrían adsorberse electrostáticamente a la PLL depositada sobre el sustrato de titanio, de manera de optimizar el cubrimiento de la superficie.

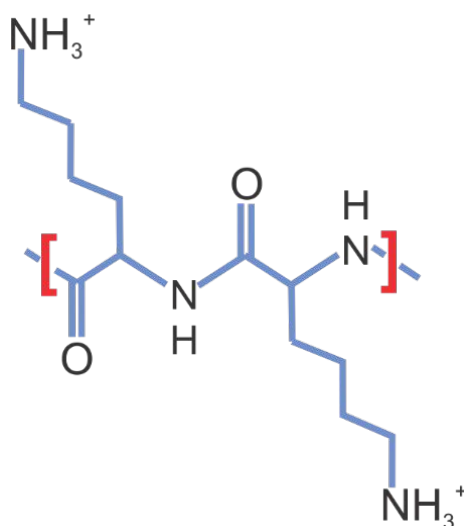


Figura 6.1: estructura de la Poli-L-Lisina a pH fisiológico.

En este capítulo se describe el diseño y la caracterización de superficies de titanio funcionalizadas con AgNPs cuya adsorción está mediada por una capa de PLL. Se estudiaron, además, la actividad antimicrobiana y la biocompatibilidad de estas superficies.

## 6.2 Preparación de los sustratos, funcionalización y caracterización.

### 6.2.1 Funcionalización de Ti con PLL y AgNPs

Se utilizaron discos de Ti de 1 cm de diámetro (99.9 %, Advent Research Materials) pulidos a grado especular tal como se detalló en el Capítulo 4. Antes de cada experimento, los sustratos fueron lavados vigorosamente con etanol y sonicados en agua bidestilada para remover las impurezas y restos del material de pulido. Una vez secos, los discos fueron modificados con PLL mediante su inmersión en una solución de PLL 0,1% p/v (Sigma Aldrich), durante 10 minutos en un baño ultrasónico termostatzado a 37°C. Luego, los sustratos funcionalizados (Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL) se enjuagaron cuidadosamente con agua ultrapura y se secaron en atmosfera de N<sub>2</sub>.

Para la adsorción de AgNPs se utilizó una placa *multiwell* de 24 pocillos. En cada uno de ellos se colocó un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> o Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL y se cubrieron con 1 mL de la dispersión de AgNPs (amarillas o azules, según el caso). Luego de 3 h, se retiraron los sustratos, se enjuagaron con agua Milli-Q y se dejaron secar al aire. De esta manera, como se muestra en el esquema de la figura 6.2, se obtuvieron sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL

con cada tipo de AgNPs adsorbidas sobre la superficie (Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules o amarillas, respectivamente).

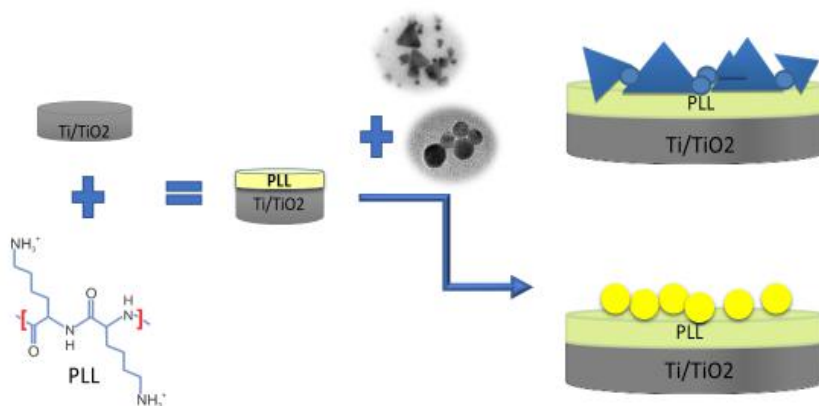


Figura 6.2: Esquema de la metodología empleada para la funcionalización de los sustratos con PLL y AgNPs.

### 6.2.2 Caracterización superficial de los sustratos obtenidos.

Para comprobar la funcionalización del Ti/TiO<sub>2</sub> con PLL se utilizó FTIR-ATR. Estas medidas fueron realizadas en la Universidad de La Laguna, a través de una colaboración con el Dr. Alberto Hernández Creus.

La figura 6.3 muestra los espectros FTIR de los sustratos modificados y sin modificar. Para la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> se encuentran, como es de esperar, las bandas a 2065 cm<sup>-1</sup> correspondientes al CO<sub>2</sub> ambiental. Por otro lado, para los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL se pueden apreciar claramente las señales características de los grupos -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, amida I y amida II [21], atribuidos a la presencia de la PLL sobre la superficie del Ti/TiO<sub>2</sub>.

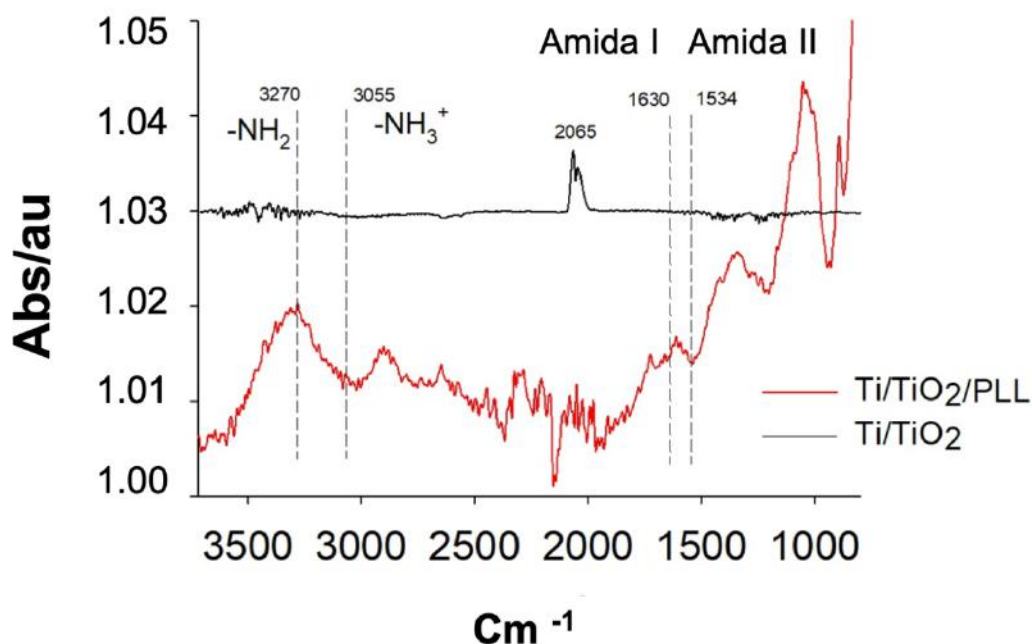


Figura 6.3: espectro FTIR-ATR de los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL

Adicionalmente, se realizaron medidas de ángulo de contacto. Para ello, sobre la superficie de los sustratos (titanio modificado y sin modificar), se volcó un volumen de 5  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, se tomó la imagen de la gota formada y se realizó la medida del ángulo de contacto. Los resultados obtenidos fueron  $\theta = 76,5^\circ \pm 3^\circ$  y  $\theta = 53^\circ \pm 5^\circ$  para Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL, respectivamente. Esta disminución en el ángulo de indica el aumento de la hidrofiliidad superficial luego de la adsorción de PLL, lo cual es consistente con trabajos publicados anteriormente, que dan cuenta del efecto en las propiedades de mojado que tienen diferentes polielectrolitos adsorbidos sobre superficies de titanio [22], [23].

Se estudió la topografía de las superficies resultantes mediante AFM en modo tapping al aire. Las imágenes obtenidas por AFM de los sustratos modificados y sin modificar se muestran en las Figuras 4 y 5. En la figura 6.4 A, correspondiente al Ti sin modificar, puede apreciarse una superficie heterogénea con rayas producidas durante el pulido. Cuando se adsorbe la PLL (figura 6.4 B) el sustrato se cubre con una capa orgánica homogénea, cuyo espesor es lo suficientemente pequeño como para percibir aún las rayas de pulido. La rugosidad superficial, medidas a partir de imágenes de 2,0

$\times 2,0 \mu\text{m}^2$  según se describió en el capítulo 2, sección 2.1.1.3, disminuye de  $R_q = 4,3 \text{ nm}$  a  $R_q = 2,8 \text{ nm}$  cuando se incorpora la capa de PLL.

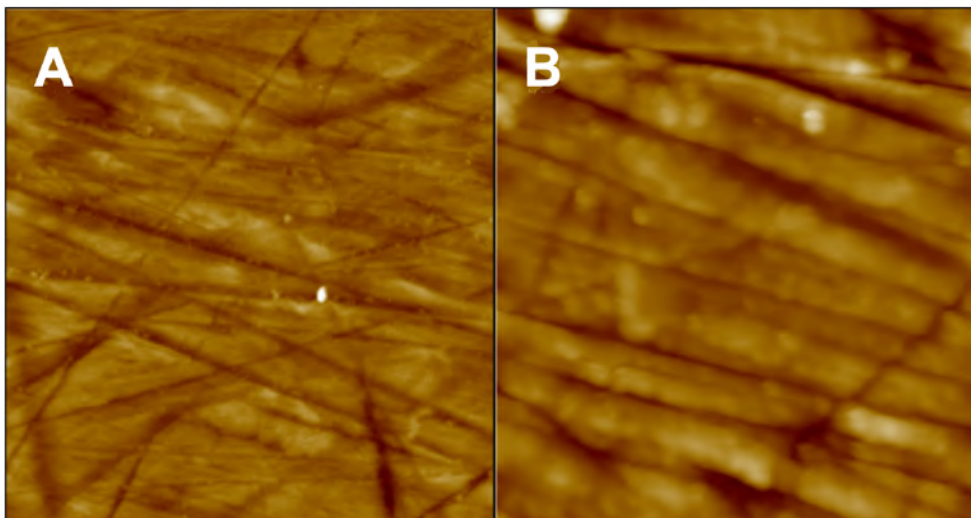


Figura 6.4: imágenes AFM  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  de A: titanio sin modificar, y B: titanio cubierto con PLL.

En la figura 6.5 se muestra la imagen AFM de un sustrato de titanio funcionalizado de forma directa con AgNPs azules (Capítulo 4), incluida aquí con fines comparativos, donde se observan los agregados de AgNPs y algunas nanopartículas individuales.

Por otro lado, las imágenes AFM de los sustratos  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$  (figura 6.6) muestran que se produce una adsorción masiva de ambas nanopartículas, azules y amarillas, en contraste con lo que ocurre en  $\text{Ti/TiO}_2/\text{AgNPs}$  (figura 6.5). Este resultado es consistente con la presencia de interacciones electrostáticas esperadas entre la PLL cargada positivamente y las AgNPs cargadas negativamente. Se observa, además, que las imágenes AFM obtenidas tienen una mejor definición de la morfología de estas nanopartículas que en el caso de los sustratos sin PLL, probablemente debido a la diferente interacción de la punta del AFM con la superficie rígida y dura de las AgNPs metálicas en contraste con la superficie más blanda del polímero [24]. Resultados similares se aprecian en la figura 6.7, donde se muestran imágenes SEM de un sustrato  $\text{Ti/TiO}_2/\text{AgNPs}$  y otro  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL/AgNPs}$  en los que se utilizaron nanopartículas azules.

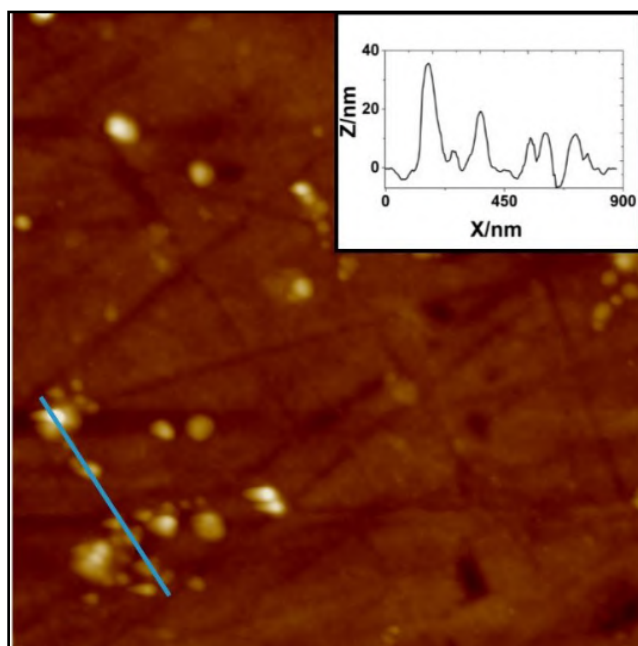


Figura 6.5: imagen AFM de  $2,0 \times 2,0 \mu\text{m}^2$  de un sustrato Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs

Nótese también que la adsorción mediada por PLL conduce a una distribución superficial de nanopartículas homogénea, independientemente del tipo de AgNPs (figura 6.6), en contraste con lo que ocurre en la adsorción directa de las AgNPs sobre Ti/TiO<sub>2</sub>. En este último caso, se forman agregados de nanopartículas que se distribuyen en toda la superficie coexistiendo con algunas nanopartículas individuales.



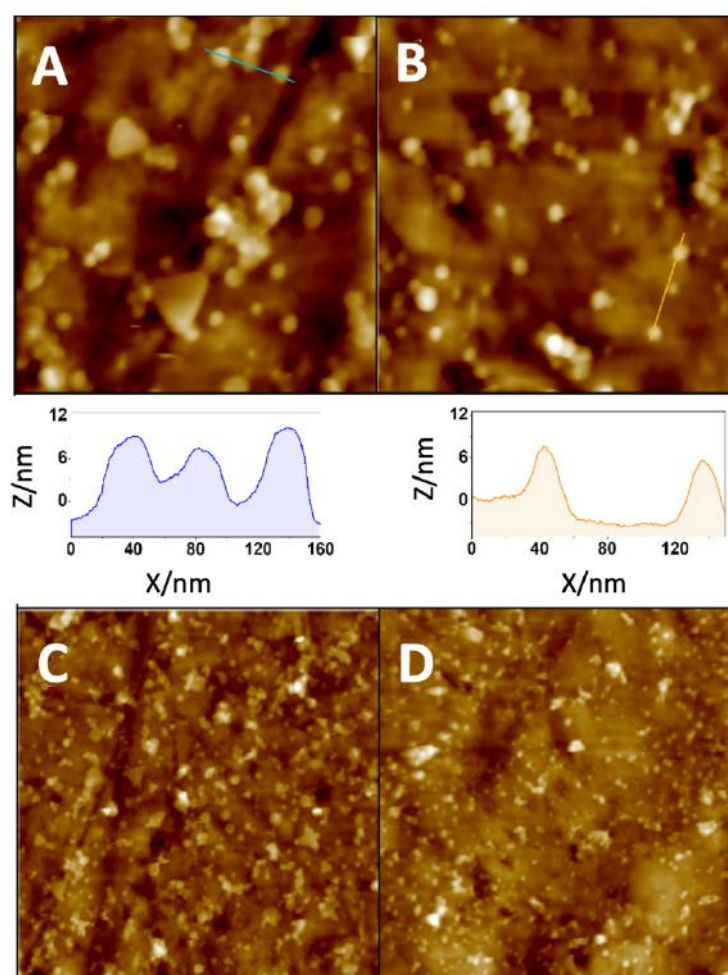


Figura 6.6: imágenes AFM ( $0,6 \times 0,6 \mu\text{m}^2$ ) de sustratos A: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs. Azules y B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillos. Debajo se muestran las secciones transversales señaladas con las líneas de colores respectivas. imágenes AFM  $2,0 \times 2,0 \mu\text{m}^2$  de sustratos C: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillos.

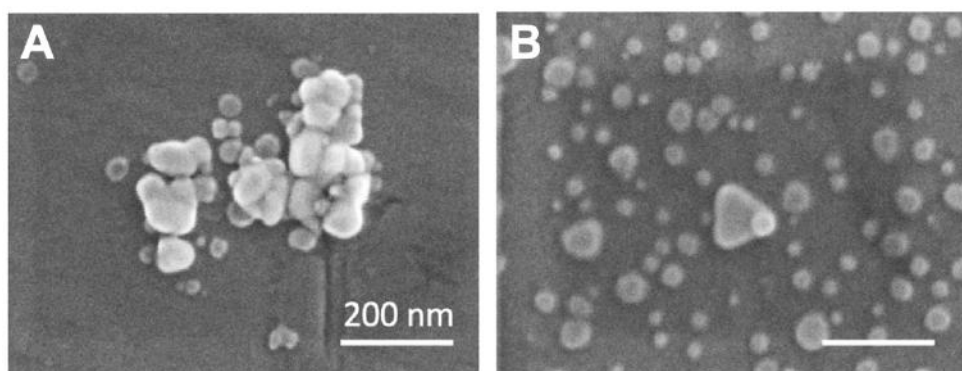


Figura 6.7: Imágenes de Microscopía Electrónica de A: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs azules, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules. La barra corresponde a 200nm.

Con el propósito de estimar la intensidad de la adsorción de las AgNPs sobre cada superficie, se midió la fuerza necesaria para removerlas arrastrándolas con una punta de AFM. Para ello, se utilizaron sustratos modificados con AgNPs azules y se barrió la superficie en modo contacto aumentando la fuerza de interacción entre la punta y la muestra hasta alcanzar la condición en la que las AgNPs eran desplazadas sobre la superficie. Dicha condición quedó evidenciada por la aparición de una región en la que no se observan nanopartículas al tomar imágenes aumentando el tamaño de la zona de barrido. La fuerza aplicada en cada caso se estimó mediante la correspondiente curva de fuerzas. Una curva de fuerza representa la deflexión del cantiléver en función de la distancia de acercamiento o retracción del mismo sobre una superficie, y establece una medida directa de la fuerza de interacción. La fuerza se calculó con la siguiente ecuación:

$$F = k \times d \quad \text{Ec. 6.1}$$

Donde  $k$  es la constante elástica del cantiléver y  $d$  es la diferencia entre la posición inicial y final de éste. En este caso, se utilizó una punta de  $k = 43 \text{ N/m}$  y  $d$  se calculó para cada curva como la distancia en  $Z$  entre la línea de base y la curva. De la misma manera se estimó el espesor de la capa de PLL, es decir se barrió el sustrato modificado con una fuerza tal que se abrió una ventana en la capa del polielectrolito. La figura 6.8 A corresponde a la imagen topográfica obtenida para un sustrato  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$  en la que se puede apreciar la “ventana” formada al barrer la superficie y los cúmulos de nanopartículas desplazadas en el borde de la ventana. La fuerza utilizada corresponde a la de la curva representada en la figura 6.8 B, mientras que la figura 6.8 C muestra la sección transversal a lo largo de la línea blanca en la figura 6.8 A. Por otro lado, se estimó la altura de la capa adsorbida midiendo la diferencia en  $z$  entre un punto fuera de la ventana y uno dentro de ésta, resultando en  $3,15 \pm 0,91 \text{ nm}$ . La fuerza calculada para barrer las AgNPs de sustratos  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$  y  $\text{Ti/TiO}_2/\text{AgNPs}$  fueron  $6,78 \text{ }\mu\text{N}$  y  $7,1 \text{ }\mu\text{N}$  respectivamente. Estos valores tan altos indican que las AgNPs se encuentran fuertemente adsorbidas sobre la superficie del sustrato, independientemente de la presencia o no de PLL, lo que permite suponer que el recubrimiento de nanopartículas será estable. El espesor medido de la capa de PLL es

similar en los sustratos  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL}$  y  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$ , indicando que durante el proceso de adsorción de nanopartículas ésta no se altera notoriamente.

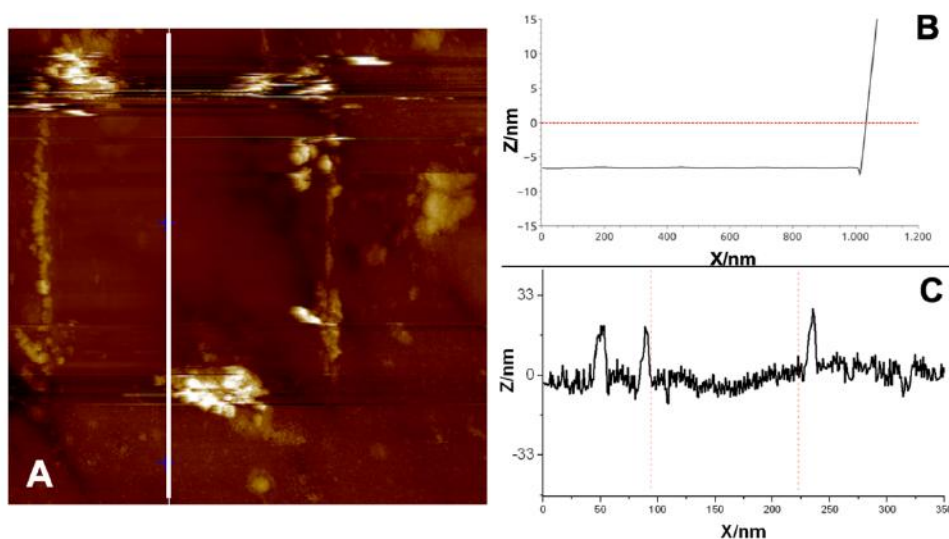


Figura 6.8: A: Imagen AFM  $15 \times 15 \mu\text{m}^2$  de un sustrato  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$  en el que se aplicó una fuerza con el cantilever de manera tal de barrer las AgNPs y la PLL, formándose una "ventana" sobre la superficie. B: curva de fuerza utilizada para los cálculos. C: Sección transversal a lo largo de la línea blanca de la figura A.

Por último, se analizó el contenido de plata total de la superficie de los diferentes sustratos (Tabla 6.1). Los resultados muestran que la en las superficies  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$  la concentración superficial promedio aumenta aproximadamente 4 y 8 veces para las AgNPs amarillas y azules, respectivamente, con respecto a la cantidad de plata encontrada en los sustratos  $\text{Ti/TiO}_2/\text{AgNPs}$ . Además, para ambos sustratos,  $\text{Ti/TiO}_2/\text{PLL-AgNPs}$  y  $\text{Ti/TiO}_2/\text{AgNPs}$  no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la cantidad de plata proveniente de la inmovilización de nanopartículas azules y nanopartículas amarillas. En este sentido, se esperaría que la adsorción producida bajo un control de transporte difusional, condujera a una mayor cantidad de AgNPs amarillas que, por ser más pequeñas, difunden más rápidamente. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que durante la adsorción de nanopartículas se dan dos procesos fisicoquímicos: la difusión y la sedimentación. El primero es el que predomina en el caso de partículas pequeñas, mientras que la sedimentación se vuelve más importante a medida que aumenta el tamaño de partículas. En este sentido, Cho *et al.*[25], estudiaron

la internalización de nanopartículas de oro de 40 nm y de 15 nm en células utilizando dos configuraciones: colocando las células por encima y por debajo de la dispersión de nanopartículas. Encontraron que utilizando alícuotas de la misma dispersión en ambas configuraciones, la cantidad de oro es similar en el caso de nanopartículas de 15 nm, indicando que la difusión prevalece sobre la sedimentación. Por el contrario, nanopartículas más grandes (40 nm o mayores, con baja velocidad de difusión y alta velocidad de sedimentación) tienden a sedimentar más rápidamente y por lo tanto hay una mayor cantidad de oro en las células ubicadas por debajo de la dispersión. Por lo tanto, las cantidades similares de Ag encontradas en este trabajo podrían estar relacionadas con la configuración experimental (sustratos en pocillos cubiertos con la dispersión de AgNPs), en la que se esperaría una mayor velocidad de sedimentación para los nanoprismas.

Tabla 6.1: concentración de plata total en los diferentes sustratos luego de 3 h de inmersión

	AgNPs azules		AgNPs amarillas	
	Ti/TiO <sub>2</sub> /AgNPs	Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL-AgNPs	Ti/TiO <sub>2</sub> /AgNPs	Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL-AgNPs
<b>Ag total (µg.cm<sup>-2</sup>)</b>	0.34 ± 0.06*	2.8 ± 0.6**	0.5 ± 0.2*	2.1 ± 0.4**

## 6.4 Estudios de inhibición del crecimiento bacteriano

### 6.4.1 Recuento de bacterias viables.

Se analizó la actividad antimicrobiana de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs en bacterias Gram (-), *P. aeruginosa*, y Gram (+), *S. aureus* y se comparó con la correspondiente a Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs. Como controles se utilizaron sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>.

Las superficies se incubaron durante 2 h en el cultivo bacteriano correspondiente, para luego ser enjuagadas y dejadas 24 h en medio GMP. Pasado este tiempo se realizaron recuentos de las bacterias viables tanto sésiles (s) como planctónicas (p). De esta manera, se obtuvieron valores del número de bacterias iniciales adheridas en cada sustrato (correspondiente a la colonización por 2 h), y de las bacterias viables remanentes, tanto en la superficie como aquellas que pudieron desprenderse y pasar a la solución luego de 24 h. El modelo experimental comprende las siguientes etapas: (1)

colonización superficial de las bacterias planctónicas presentes en el cultivo ( $t=0$ ); (2) desprendimiento de bacterias de la superficie colonizada al medio GMP estéril (cambio de fenotipo de bacterias sésiles a bacterias planctónicas) y (3) crecimiento bacteriano, tanto de células planctónicas como sésiles ( $t=24h$ ). Se cuantificaron las bacterias viables tanto en el medio líquido como en la superficie luego de las etapas (1) y (3).

*Adhesión y colonización bacteriana (etapa 1):* Los resultados se muestran en las figuras 6.9 y 6.10 como  $t=0$ . Se puede apreciar que para el caso de la cepa *S. aureus* hay una leve disminución en el número de bacterias viables en la superficie Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs respecto de la Ti/TiO<sub>2</sub>, correspondiente a un 76,34% y 62,61% cuando se adsorben AgNPs azules o amarillas, respectivamente. Esto evidencia el efecto bacteriostático producido por las superficies preparadas mediante la adsorción directa de AgNPs. Por otro lado, no se observan diferencias significativas en el número *P. aeruginosa* adheridas a las superficies (figura 6.10). Esto puede atribuirse a la existencia de una mayor cantidad de EPS secretado por este microorganismo en la etapa de adhesión durante la formación de biofilms (ver Capítulo 1, sección 3) [26]. De hecho, *P. aeruginosa* es muy utilizada como una cepa modelo de producción de EPS [27].

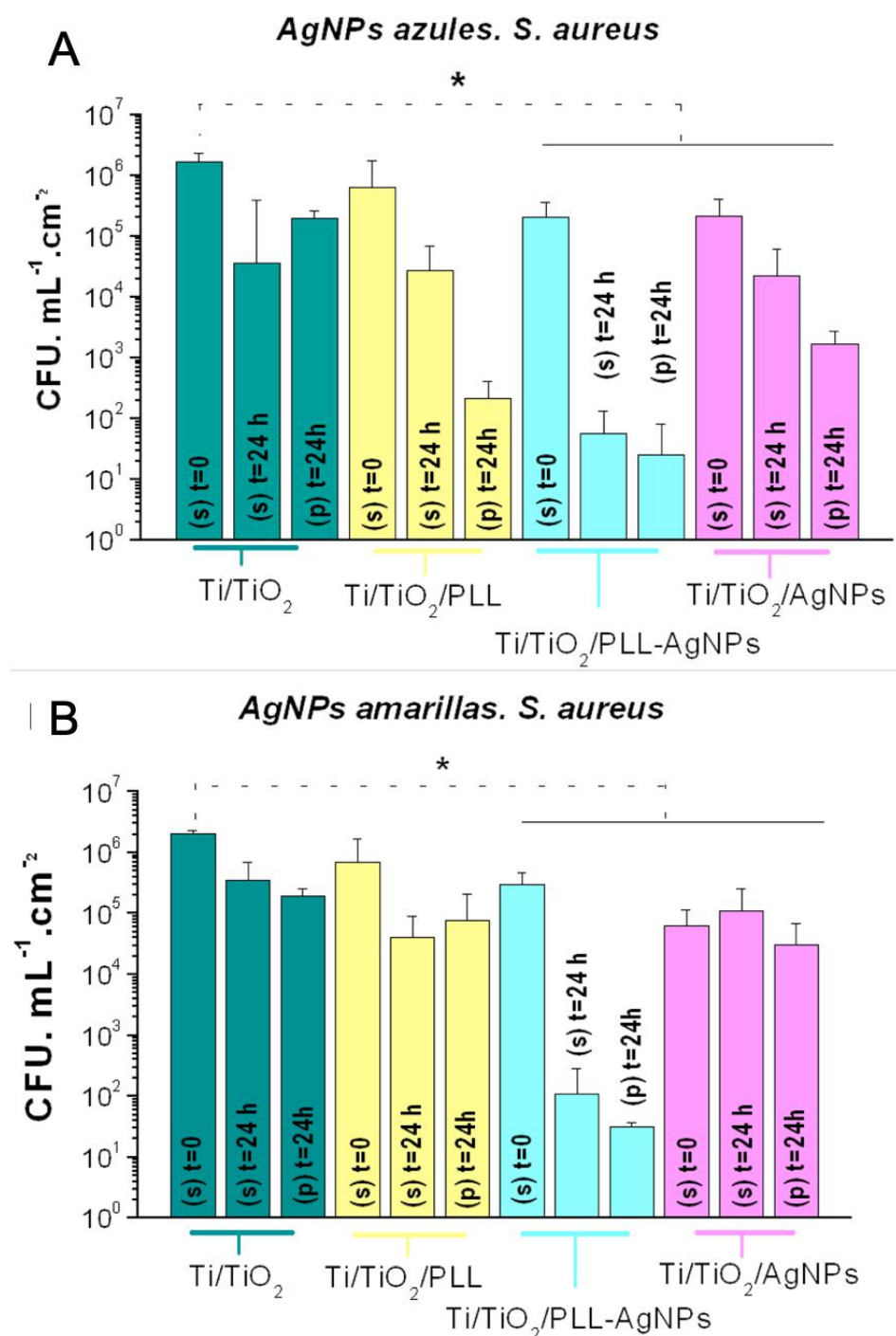


Figura 6.9: Recuento de bacterias viables luego de 24h en contacto con A: *S. aureus*, AgNPs azules y B: *S. aureus*, AgNPs amarillas;. Para cada sustrato: (s) t=0, células sésiles viables iniciales; (s) t=24 células sésiles viables luego de 24h; (p) t=0 células plasmónicas viables iniciales y (p) t=24h, células plasmónicas viables a las 24h.\* indica diferencias significativas (p<0.05).

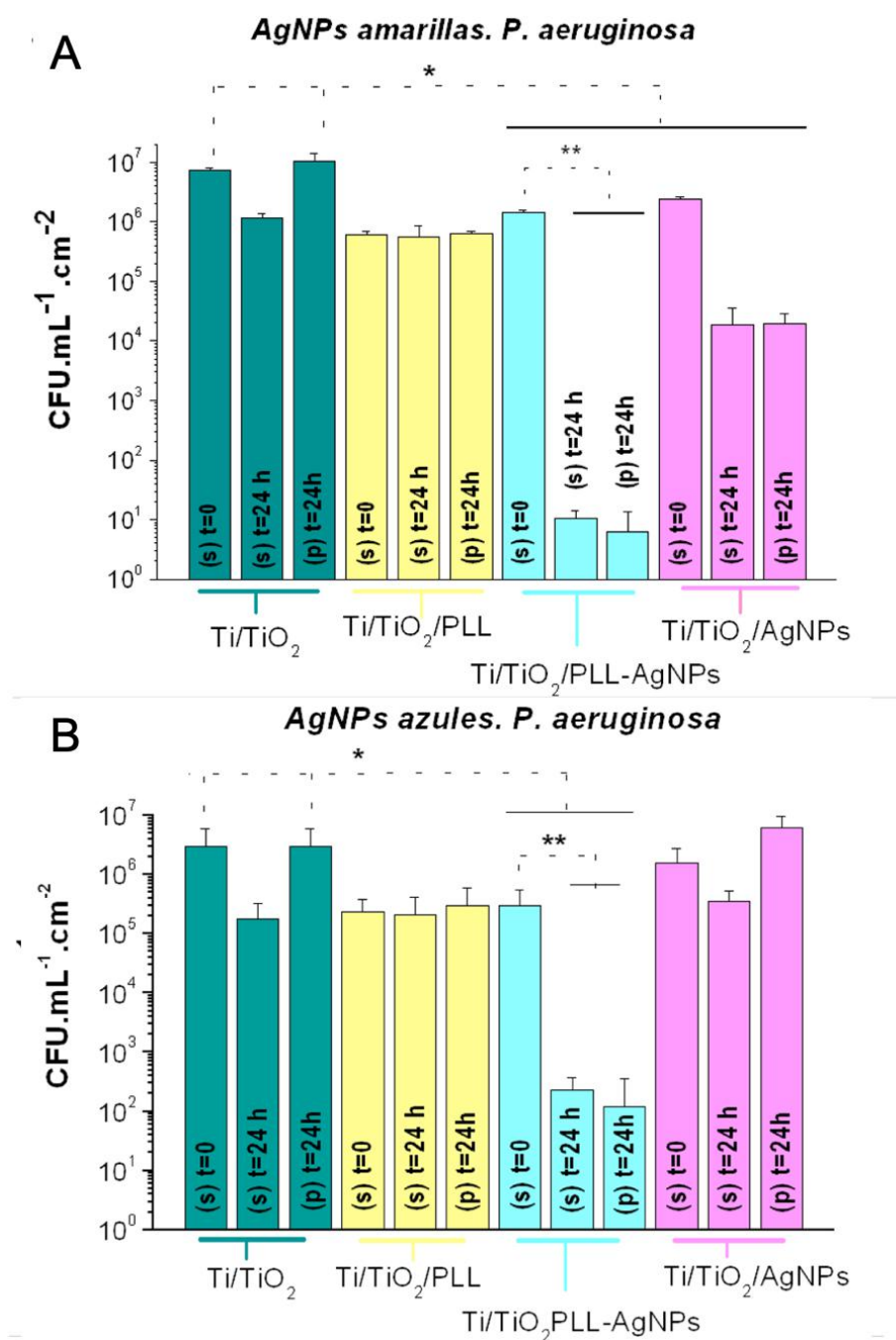


Figura 6.10: Recuento de bacterias viables luego de 24h en contacto con A: *P. aeruginosa*, AgNPs azules y B: *P. aeruginosa*, AgNPs amarillas;. Para cada sustrato: (s) t=0, células sésiles viables iniciales; (s) t=24 células sésiles viables luego de 24h; (p) t=0 células plasmónicas viables iniciales y (p) t=24h, células plasmónicas viables a las 24h.\* indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



Se realizaron estudios del material polimérico adherido sobre los diferentes sustratos expuestos al cultivo bacteriano en las mismas condiciones utilizadas para el recuento bacteriano, mediante el kit comercial FilmTracer™ de Invitrogen (figuras 6.11-6.16). El colorante SYPRO® tiñe varias de las proteínas secretadas que forman parte de la matriz extracelular, como por ejemplo glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas unidoras de calcio y proteínas fibrilares, entre otras. Algunas de estas moléculas están presentes también dentro de las células bacterianas, por lo que éstas también son teñidas por el colorante, pudiendo ser observadas al microscopio. En estas imágenes se puede apreciar claramente que luego de 2h de adhesión, *P. aeruginosa* produce cantidades similares de EPS sobre Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs (Figuras 6.11 A, 6.13 A y 6.13 C), lo que es consistente con la similar viabilidad bacteriana encontrada. Una explicación posible del escaso efecto antimicrobiano de Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs está relacionado con la composición del EPS: entre los polisacáridos identificados en la matriz extracelular de *P. aeruginosa*, se encuentran el alginato y el Pel que poseen carga negativa y han sido reconocidos como los principales responsables en la resistencia del biofilm a algunos antimicrobianos catiónicos, como por ejemplo los aminoglucósidos como gentamicina o tobramicina [28], [29]. Este efecto se puede explicar en términos de las interacciones electrostáticas entre estas moléculas de carga negativa que generan un decaimiento en el gradiente de concentración de Ag<sup>+</sup>, interfiriendo con la acción antimicrobiana. Por lo tanto, se puede interpretar que la similar viabilidad de *P. aeruginosa* encontrada en los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs es debido a la interferencia del EPS en la liberación y difusión de iones Ag<sup>+</sup>.

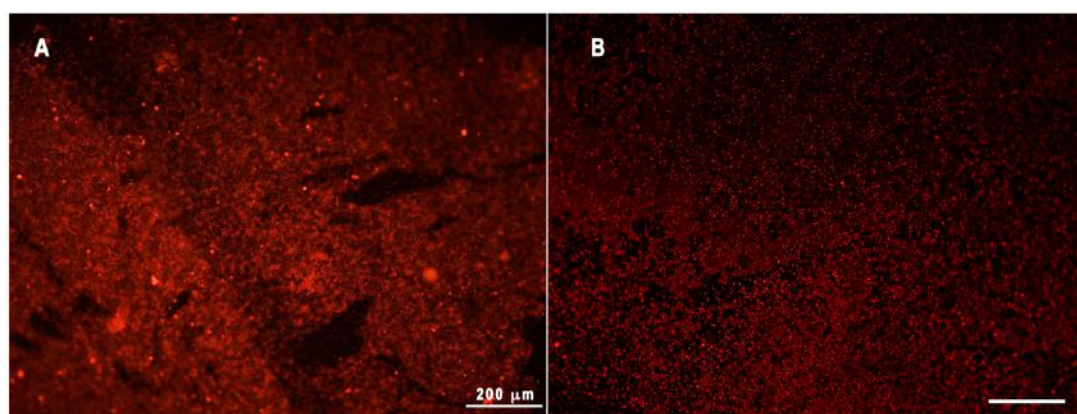


Figura 6.11: imágenes de fluorescencia del EPS secretado por A: *P. aeruginosa*, y B: *S. aureus*, luego de 2 h de contacto con titanio sin modificar.



En el caso de *S. aureus*, la cantidad de EPS es notablemente menor en todos los sustratos (figuras 6.11 A y 6.12), por lo que no interferiría en el efecto bacteriostático de Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs y Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs.

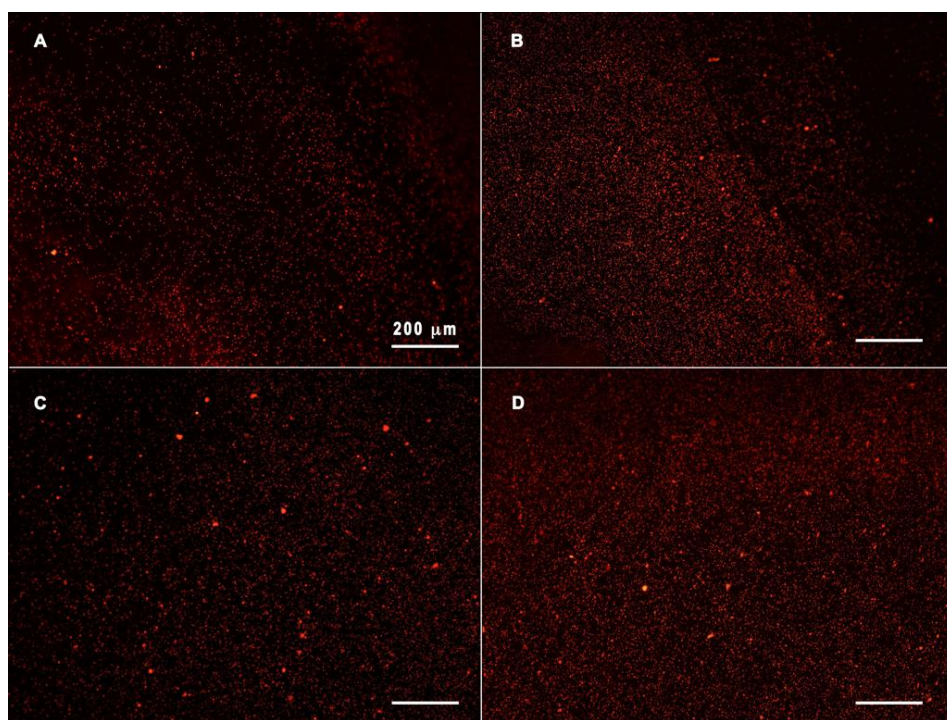


Figura 6.12: imágenes de fluorescencia del EPS secretado por *S. aureus*, luego de 2 h de contacto con A: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs amarillas, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillas, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs azules, y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules.

Respecto a los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL, se ve que el recuento de UFC a t=0 no difiere significativamente del obtenido para las superficies Ti/TiO<sub>2</sub>, tanto para *S. aureus* (figura 6.10) como para *P. aeruginosa* (figura 6.11), lo que indica que la PLL no influye sobre la adhesión o la viabilidad de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. En este sentido, Conte et al. han reportado actividad antimicrobiana de PLL en solución acuosa sobre células planctónicas de diferentes microorganismos, entre ellos *P. aeruginosa* y *S. aureus* [30], sin embargo, este efecto no se evidenció en las condiciones ensayadas durante el presente trabajo de tesis.

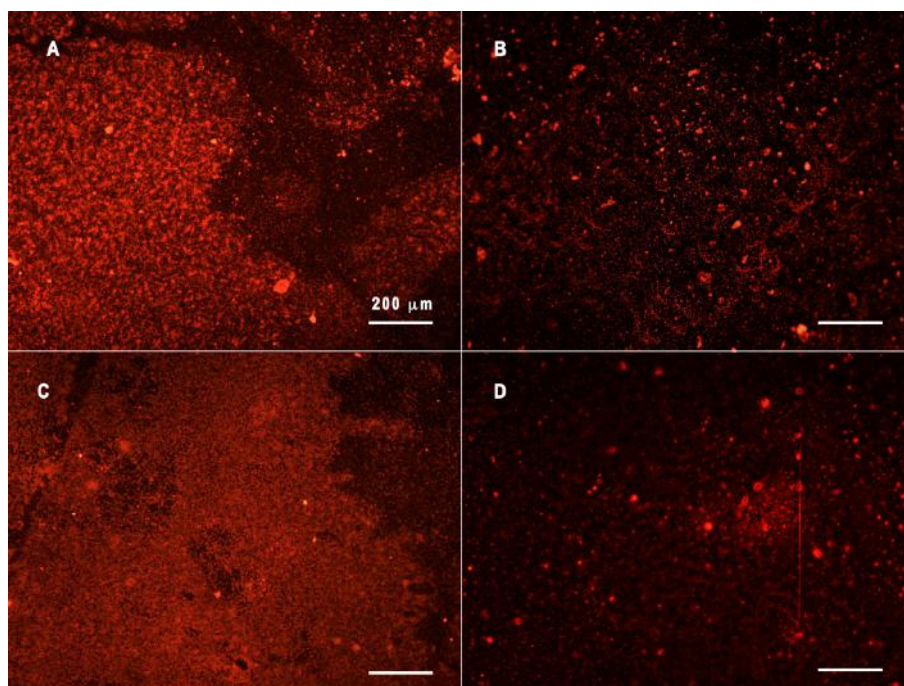


Figura 6.13: imágenes de fluorescencia del EPS secretado por *P. aeruginosa*, luego de 2 h de contacto con A: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs amarillas, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillas, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs azules, y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules.

*Crecimiento bacteriano (etapa 3):* Los resultados se muestran en las figuras 6.9 y 6.10 como t=24. El análisis de viabilidad utilizando Ti/TiO<sub>2</sub> en GMP muestra que el número de UFC es similar en la superficie (bacterias sésiles) y en el sobrenadante (bacterias planctónicas), confirmando que el medio es adecuado para el crecimiento celular, tal como se mencionó en el Capítulo 3, sección 3.1.4. Asimismo, el número de bacterias viables encontradas luego de 24 h sobre Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL no difiere significativamente de las halladas en Ti/TiO<sub>2</sub>, lo que confirma que la PLL utilizada en este trabajo no afecta la viabilidad de ambas cepas, *S. aureus* (figura 6.9) y *P. aeruginosa* (figura 6.10).

Los resultados obtenidos para los sustratos multifuncionalizados Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillas o azules (figuras 6.9 y 6.10), muestran una importante reducción en el número de células viables capaces de reproducirse y crecer adheridas a estas superficies para ambas cepas bacterianas. Es importante resaltar que, independientemente del tamaño de las AgNPs que se encuentren adsorbidas, las superficies producen un efecto bactericida, definido como una disminución en el número de bacterias viables de al menos tres órdenes de magnitud con respecto al control [31].

Los valores de la reducción logarítmica calculados se resumen en la Tabla 6.2. Cabe destacar que el efecto bactericida obtenido luego de 24 h de incubación puede atribuirse solamente a la alta cantidad de plata adsorbida sobre las superficies Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs, ya que el EPS no es evidente en esas superficies (figuras 6.15 B y D, y figuras 6.16 B y D).

Tabla 6.2: Disminución de la viabilidad de las bacterias sésiles adheridas a los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs luego de 24 h de incubación respecto de control Ti/TiO<sub>2</sub>

Reducción de bacterias viables (Log)	Respecto de Ti/TiO <sub>2</sub> a t=0 (bacterias sésiles iniciales)	Respecto de Ti/TiO <sub>2</sub> a t=24 h (control de crecimiento)
<i>S. aureus</i> , Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL-AgNPs amarillas	4.2	3.5
<i>S. aureus</i> , Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL AgNPs azules	4.4	2.8
<i>P. aeruginosa</i> , Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL AgNPs amarillas	5.8	5.0
<i>P. aeruginosa</i> , Ti/TiO <sub>2</sub> /PLL AgNPs azules	4.1	2.9

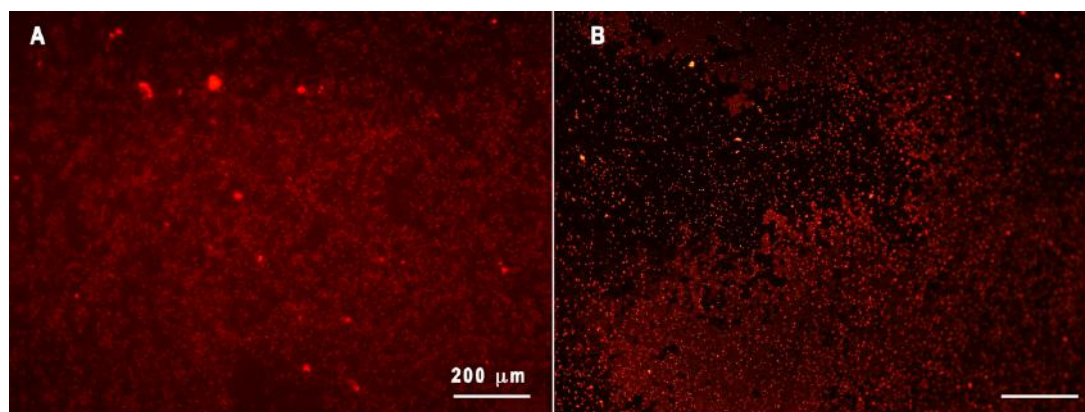


Figura 6.14: imágenes de fluorescencia del EPS secretado por A: *P. aeruginosa*, y B: *S. aureus*, luego de 24h de contacto con titanio sin modificar.



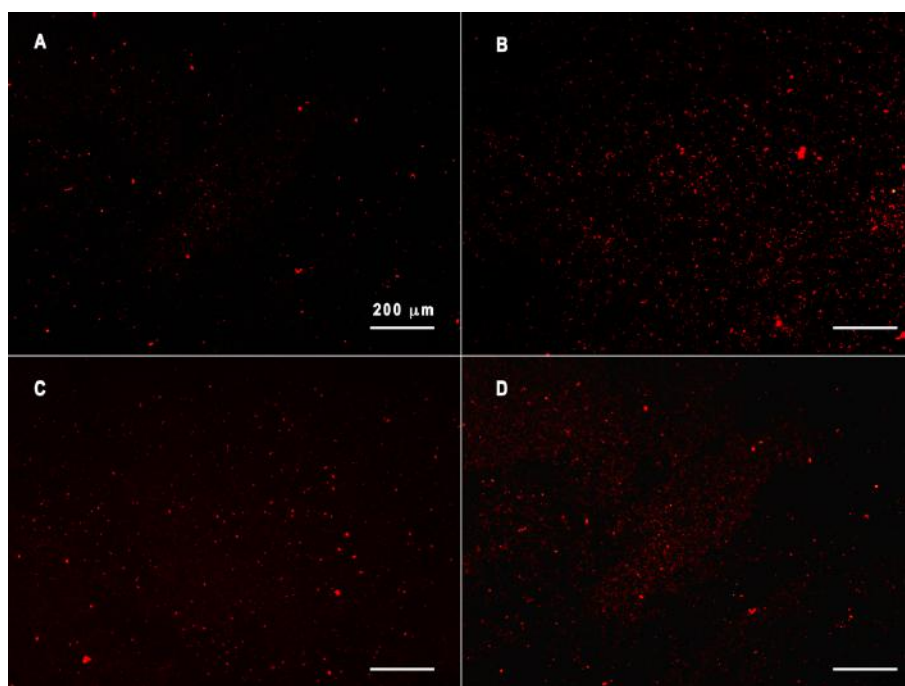


Figura 6.15: imágenes de fluorescencia del EPS secretado por *P. aeruginosa*, luego de 24 h de contacto con A: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs amarillas, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillas, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs azules, y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules.

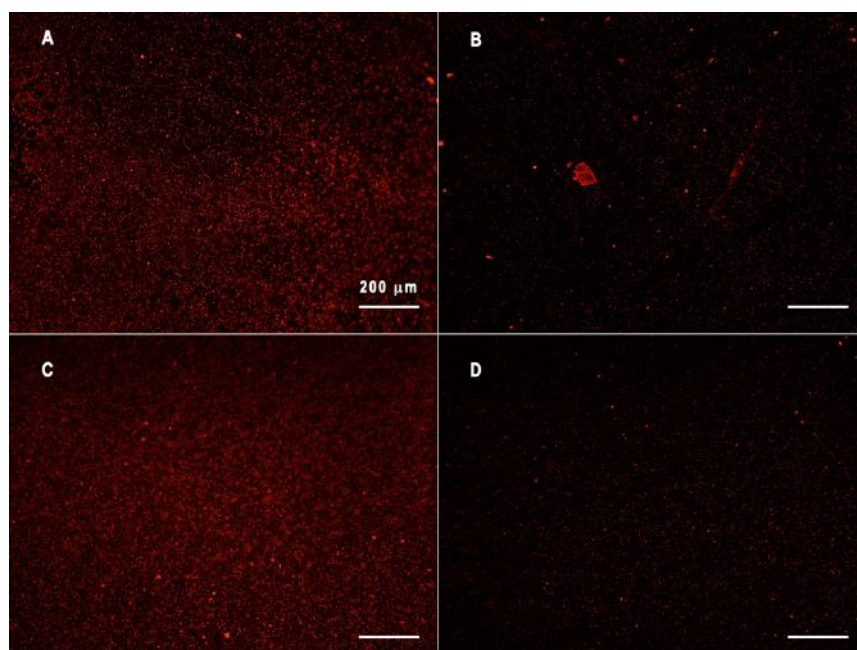


Figura 6.16: imágenes de fluorescencia del EPS secretado por *S. aureus*, , luego de 24 h de contacto con A: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs amarillas, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs amarillas, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs azules, y D: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules.

Se realizó el análisis cualitativo de las bacterias sésiles viables respecto de las inicialmente adheridas a la misma superficie mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando el *kit* Live/Dead BacLight (Invitrogen). La tinción permite observar en color verde las bacterias vivas y en rojo, aquellas que están muertas. Se estudiaron las bacterias adheridas a Ti/TiO<sub>2</sub>, Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs y Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs para ambas cepas ensayadas luego de 24 h de incubación (figura 6.17). Se puede apreciar que, en concordancia con los resultados del recuento de bacterias viables, los controles Ti/TiO<sub>2</sub> contienen mayormente bacterias vivas, independientemente de la especie bacteriana. Por otro lado, para *S. aureus*, se observan algunas bacterias muertas en los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs y, finalmente, mayoritariamente células muertas en los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs (Figura 6.17 A-C). Para el caso de *P. aeruginosa*, las imágenes de Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs muestran el predominio de bacilos viables, y solamente se observan bacterias muertas en la superficie Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs (figura 6.17 D-F).

Es importante mencionar que la condición bactericida se alcanza cuando el número de bacterias viables encontradas sobre Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs luego de 24 es comparado con el número inicial de bacterias (t=0) sobre los controles Ti/TiO<sub>2</sub>. Es decir, los microorganismos estudiados no sólo no son capaces de replicarse y crecer, sino que mueren al adherirse a la superficie. Este hallazgo es sumamente importante ya que en el contexto de las superficies funcionalizadas, la acción antibacteriana depende precisamente de la concentración superficial del agente antimicrobiano, siendo ésta generalmente lo suficiente baja para inhibir la adhesión bacteriana y/o la proliferación de los microorganismos (efecto bacteriostático), pero no lo suficientemente elevada como para alcanzar condiciones bactericidas. De hecho, se suele hacer referencia a “superficies antimicrobianas” como aquellas capaces de prevenir o limitar el crecimiento y la proliferación de bacterias [32], en contraste con lo que frecuentemente se entiende como “antimicrobiano” en referencia a cualquier agente capaz de eliminar bacterias.

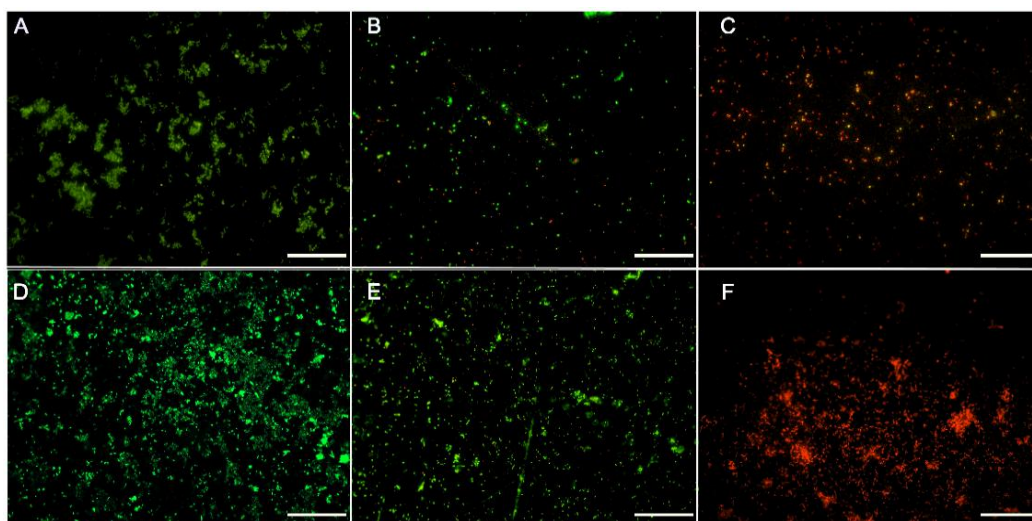


Figura 6.17: Imágenes de epifluorescencia de bacterias sésiles luego de 24 h de incubación en medio GMP. Los sustratos se modificaron con AgNPs azules. A: *S. aureus* en Ti/TiO<sub>2</sub>; B: *S. aureus* en Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs; C: *S. aureus* en Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs; D: *P. aeruginosa* en Ti/TiO<sub>2</sub>; E: *P. aeruginosa* en Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs; F: *P. aeruginosa* en Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs

### 6.5 Estudio de la estabilidad de las AgNPs adsorbidas y de la liberación de plata.

Se analizó la estabilidad de las AgNPs de las muestras Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules. Para esto, se observaron por AFM diferentes sustratos luego de sumergirlos durante 2 h en medio de cultivo (figura 6.18 A) o bien durante 5 días en agua ultrapura (figura 6.18 B). Como puede apreciarse, las AgNPs permanecen adsorbidas sobre la superficie, indicando que la acción bactericida se debe a la liberación de iones Ag<sup>+</sup> al medio y no a una liberación de AgNPs que luego actúen sobre los microorganismos.

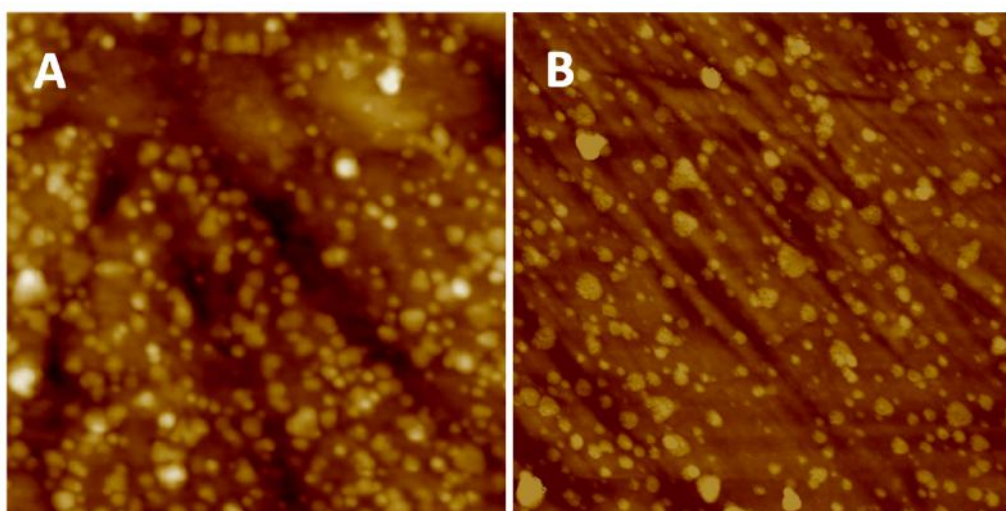


Figura 6.18: A: Imagen de  $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$  de un sustrato Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs luego de 2 h en caldo nutritivo. B: Imagen de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  de un sustrato Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs luego de 5 días en agua ultrapura.

La alta estabilidad de las AgNPs adsorbidas permitiría una liberación progresiva de iones y, por lo tanto, un efecto antimicrobiano sostenido en el tiempo. En efecto, se cuantificó mediante ICP-AES la concentración de iones Ag<sup>+</sup> liberados por los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules durante 24 h (correspondiente al tiempo que dura el ensayo antimicrobiano) y 5 días (correspondiente a períodos más largos). Los valores obtenidos se detallan en la Tabla 6.3, en la que también se incluyen los valores de Ag<sup>+</sup> total inicial con fines comparativos. Se puede notar que la cantidad de plata liberada es similar para ambos tiempos ensayados para cualquiera de las dispersiones de AgNPs, revelando que liberación de iones es lenta pero sostenida en el tiempo.

Tabla 6.3: Medidas de Ag<sup>+</sup> liberada de los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs luego de 24 h y 5 días en agua destilada. Con fines comparativos se incluyen los datos de la Tabla 6.1 para comparar.

Ag <sup>+</sup> ( $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ )	AgNPs azules			AgNPs amarillas		
	Inicial	24 h	5 días	Inicial	24 h	5 días
	$2.8 \pm 0.6$	$0.55 \pm 0.3$	$0.43 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.4$	$0.57 \pm 0.3$	$0.49 \pm 0.1$

Es probable que esta similitud encontrada en la cinética de liberación para ambas dispersiones de AgNPs esté relacionada con la polidispersidad que presentan las AgNPs azules, ya que una gran proporción de las nanopartículas de esta dispersión son

de un tamaño similar al promedio de las AgNPs amarillas. Para ambas dispersiones se calculó que la cantidad de plata liberada fue de 20% del total para las AgNPs amarillas y un 15% para las AgNPs azules. Estos resultados son acordes a las imágenes obtenidas por AFM y confirman que, debido a la alta estabilidad en medio acuoso de las nanopartículas adsorbidas, no se produce liberación de AgNPs desde la superficie. Este efecto fue estudiado por Ocwieja et al [33], quienes modificaron superficies con diferentes polielectrolitos y AgNPs, y encontraron que las monocapas de AgNPs más estables se obtenían utilizando PLL como capa soporte. En éstas, la cantidad de plata liberada es de un 50% luego de 18 días. Entonces, con estos resultados, resulta razonable especular que las interacciones entre AgNPs y la pared celular o la membrana externa de la bacteria solamente serían posibles para la porción de la célula que se encuentra en contacto con la superficie modificada [34] y que, por lo tanto, el efecto antibacteriano que se ha reportado en otros trabajos debido a la internalización celular de nanopartículas en dispersión [35] no ocurriría en el sistema estudiado en este trabajo de tesis.

## **6.6 Estudios de biocompatibilidad de los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs**

Se analizó la adhesión y proliferación celular sobre los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs desarrollados en este trabajo. Para estudiar la biocompatibilidad de la plataforma, se trabajó con células eucariotas pre-osteoblásticas (MC3T3-E1), ya que pertenecen al tipo de tejido al que se expondrían los materiales implantables en el cuerpo humano. Se realizaron ensayos de adhesión de estas células a los sustratos, análisis de la viabilidad de las mismas y ensayos de proliferación a 7 días, utilizando la metodología experimental descrita en el Capítulo 3, sección 3.4.3.2.

### **6.6.1 Adhesión y viabilidad de osteoblastos.**

A partir de imágenes de epifluorescencia (figura 6.19), se calculó el % de células adheridas a los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules respecto del control Ti/TiO<sub>2</sub> luego de 24 h de incubación en medio DMEM a 37°C mediante la tinción con naranja de acridina y la utilización del software ImageJ. Los resultados se muestran en la figura 6.20 A, donde puede observarse que no hay diferencias significativas en el número de células adheridas respecto del control para ambos tipos de nanopartículas ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se estudió la viabilidad de las células adheridas a los diferentes sustratos, analizando el % de células fluorescentes rojas respecto del control. Para ello se utilizó



el *kit* comercial de viabilidad celular Live/Dead de Invitrogen (Capítulo 3, sección 3.4.4), y se encontró que en todos los sustratos ensayados las células adheridas permanecen en un alto porcentaje metabólicamente activas luego de 24 h de contacto con las superficies (figura 6.20 B). Estos resultados indican una buena respuesta celular inicial hacia los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs, mostrando que los mismos son biocompatibles en estas condiciones.

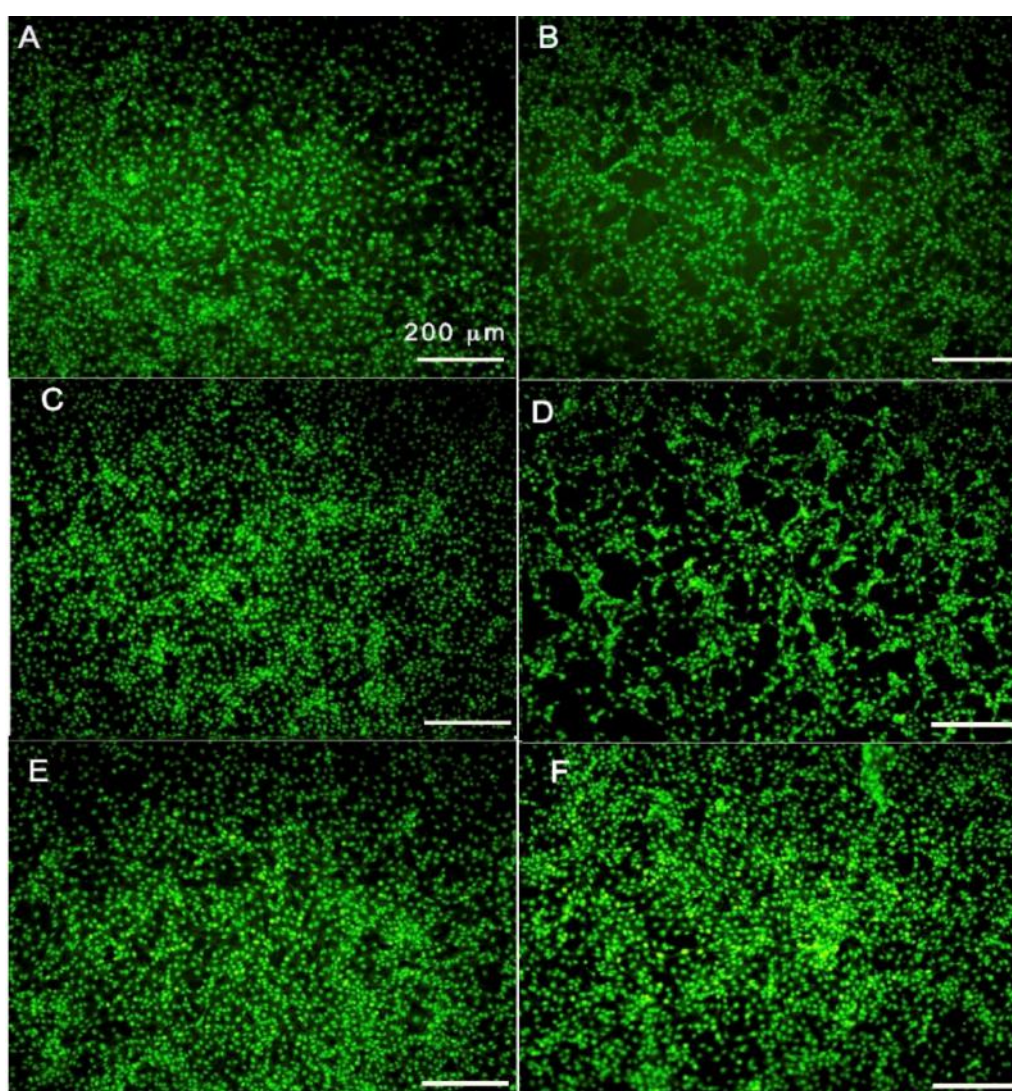


Figura 6.19: Tinción con naranja de acridina de células pre-osteoblásticas adheridas a los sustratos luego de 24h: A:Ti/TiO<sub>2</sub>, B: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL, C: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs azules, D: Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs amarillos, E: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules y F: Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs

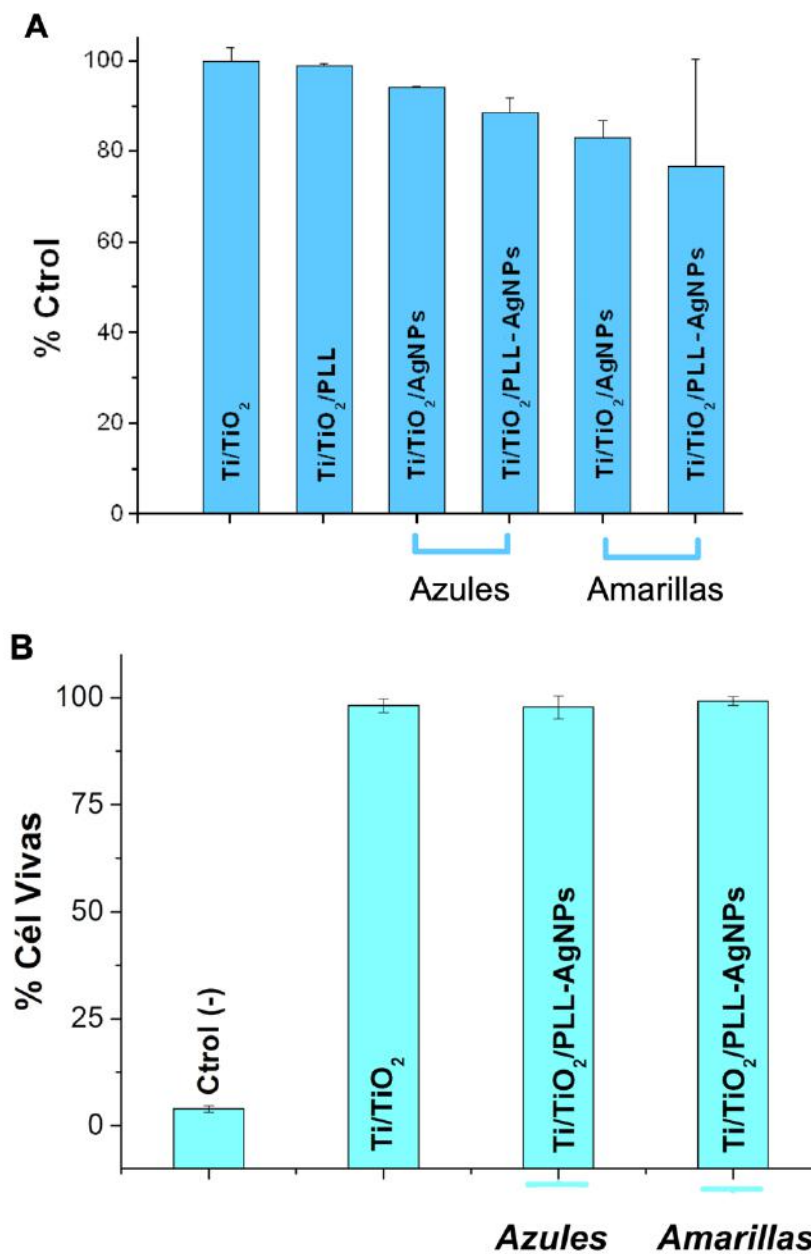


Figura 6.20: A: porcentaje de células adheridas a cada sustrato respecto del control. B: porcentaje de células vivas adheridas sobre los sustratos ensayados. El control (-) corresponde a un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> incubado con células durante 24 h y luego tratado con peróxido de hidrógeno 10% por 5 minutos.

### 6.6.2 Estudio de proliferación de células eucariotas

Se estudió la predisposición a la regeneración del tejido circundante al material modificado a través de la evaluación de proliferación de células MC3T3-E1 en los sustratos modificados Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules. Para esto, se procedió de la misma forma que en los ensayos de adhesión, pero esta vez dejando los sustratos durante 7 días en medio de crecimiento rico (DMEM) para permitir la proliferación celular. Durante este período se fue cambiando el medio para evitar la muerte de las células por acidificación del mismo. Una vez pasado este tiempo, se determinó el número de células sobre cada superficie y se comparó respecto del control de titanio sin modificar. En la imagen de epifluorescencia (figura 6.21) se puede apreciar la confluencia de las células y su forma alargada (figura 6.21 A, flechas blancas), así como también el esparcimiento aleatorio por toda la superficie, como puede apreciarse por la cantidad de núcleos teñidos en la figura 6.21 B. Hadjicharalambous *et al.* analizaron la adhesión y el esparcimiento de células MC3T3-E1 sobre sustratos modificados con polímeros, encontrando que la alteración de la morfología de la célula en un sustrato afecta su forma y la distribución de los puntos de adhesiones focales [36], fundamentales para la adhesión y comunicación con el material extracelular y células aledañas. De hecho, otros autores reportaron que muchos procesos biológicos de las células, como el crecimiento, diferenciación, migración, apoptosis, se encuentran influenciados por cambios en la morfología celular [37]–[39]. La morfología de los osteoblastos observada luego de 7 días en contacto con los sustratos multifuncionalizados se corresponde con células sanas, en forma de huso y confluentes entre sí, indicando una muy buena interacción con la superficie.

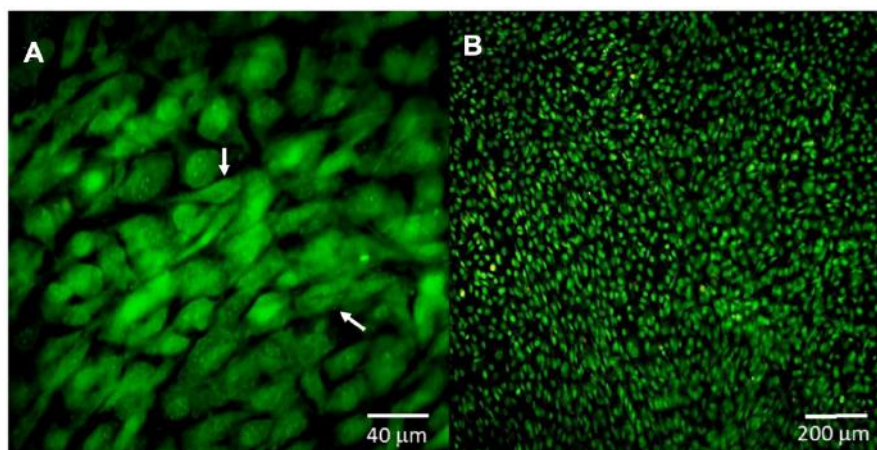


Figura 6.21: Imágenes de osteoblastos teñidos con naranja de acridina sobre Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs azules luego de 7 días. (a) 40X; (b) 10X.

En la figura 6.22 se muestra un gráfico evidenciando la proliferación celular a los 7 días para los diferentes sustratos. Los resultados muestran que las superficies Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs posibilitan no sólo la adhesión sino también la proliferación de células pre-osteoblásticas. Así, se puede inferir que las superficies desarrolladas son biocompatibles y permiten el crecimiento *in vitro* de células progenitoras de tejido óseo.

La buena biocompatibilidad encontrada está probablemente relacionada con dos características importantes del sistema estudiado: las AgNPs están ancladas a la superficie y se produce una liberación lenta de una concentración relativamente baja de iones Ag<sup>+</sup>. Por un lado, al estar las AgNPs fuertemente adsorbidas sobre la superficie (figura 6.8) y ser estables en medio acuoso (figura 6.17), el potencial efecto citotóxico que podría producirse debido a la internalización de nanopartículas está impedido. Por otro lado, la baja cantidad de iones Ag<sup>+</sup> liberados no contribuiría a la citotoxicidad de las AgNPs.

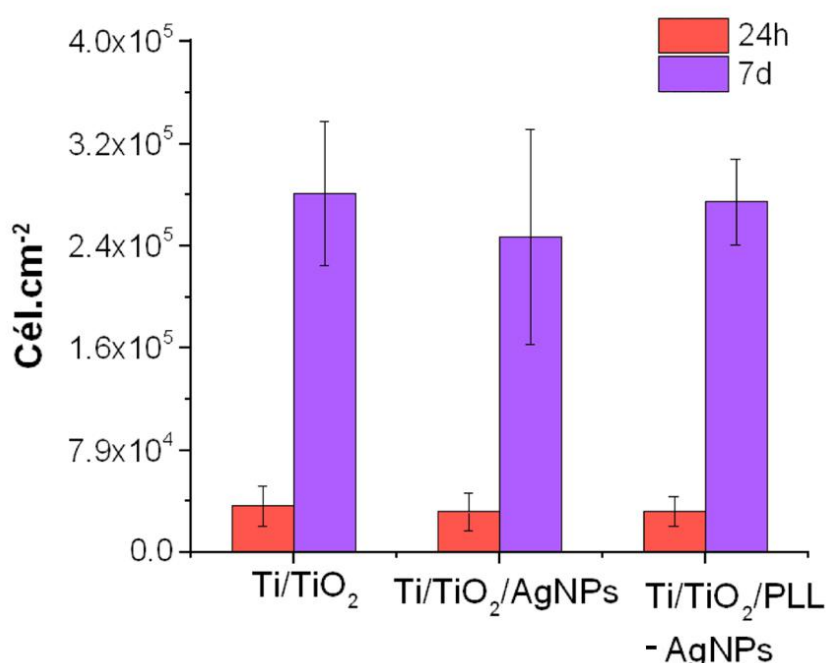


Figura 6.22: Proliferación de células pre-osteoblásticas sobre los distintos sustratos. No se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos luego de 7 días.

## 6.7 Conclusiones:

Se logró la modificación superficial de Ti/TiO<sub>2</sub> con PLL, como se demostró mediante espectroscopia FTIR y medidas de ángulo de contacto. Debido a que esta modificación introduce cargas positivas en la superficie, se logró exitosamente la incorporación de AgNPs de distintos tamaños recubiertas con citrato. El acondicionamiento superficial que genera la PLL influye en la adsorción de estas AgNPs, por un lado, a través del aumento de la cantidad, y por el otro evitando la formación de agregados, que sí están presentes en la adsorción directa sobre Ti/TiO<sub>2</sub>.

Las superficies de Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs demostraron favorecer la actividad antimicrobiana tanto contra *S. aureus*, Gram (+), como sobre *P. aeruginosa*, Gram (-), ya que se alcanzan condiciones bactericidas para ambas especies y para ambos tamaños de AgNPs. Esto constituye un hallazgo sumamente novedoso y significativo, ya que resulta muy difícil obtener superficies con propiedades bactericidas, debido a que, en general, las concentraciones superficiales de las especies activas adsorbidas suelen ser bajas, alcanzando únicamente un efecto bacteriostático. Concretamente, las superficies preparadas en este trabajo son capaces de matar el 99,999% de las bacterias adheridas inicialmente, siendo este un aspecto fundamental en la prevención de la formación de biofilms.

Además, las superficies muestran buena biocompatibilidad *in vitro*, otro factor fundamental a tener en cuenta a la hora de pensar en una posible implementación del desarrollo en dispositivos implantables.

## 6.8 Bibliografía

- [1] L. Juan, Z. Zhimin, M. Anchun, L. Lei, and Z. Jingchao, "Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 5, no. 1, pp. 261–267, 2010.
- [2] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, "Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver," *Nanoscale*, vol. 5, no. 16, pp. 7328–7340, Aug. 2013.
- [3] Q. Wang, H. Yu, L. Zhong, J. Liu, J. Sun, and J. Shen, "Incorporation of silver ions into ultrathin titanium phosphate films: In situ reduction to prepare silver nanoparticles and their antibacterial activity," *Chem. Mater.*, vol. 18, no. 7, pp. 1988–1994, Apr. 2006.
- [4] A. V. Bordoni, M. M. Zalduendo, A. Escobar, H. Amenitsch, S. E. Moya, and P. C. Angelomé, "Phosphonate mesoporous hybrid thin films: Synthesis of organophosphosilane by thiol-ene click chemistry and applications in formation and stabilization of silver nanoparticles," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 295, Mar. 2020.
- [5] S. SHIMA and H. SAKAI, "Polylysine produced by *Streptomyces*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 41, no. 9, pp. 1807–1809, 1977.
- [6] W. M. Huang, S. J. Gibson, P. Facer, J. Gu, and J. M. Polak, "Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of l-lysine as a slide coating," *Histochemistry*, vol. 77, no. 2, pp. 275–279, 1983.
- [7] M. Bussiek, N. Mücke, and J. Langowski, "Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 22, pp. 137e – 137, Nov. 2003.
- [8] K. Takahashi, M. Fukada, M. Kawai, and T. Yokochi, "Detection of lipopolysaccharide (LPS) and identification of its serotype by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using poly-l-lysine," *J. Immunol. Methods*, vol. 153, no. 1–2, pp. 67–71, Aug. 1992.
- [9] G. L. Kenausis *et al.*, "Poly( l -lysine)- g -Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption <sup>†</sup>," *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 14, pp. 3298–3309, 2000.
- [10] L. C. Baxter *et al.*, "Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphatesurfaces," *Eur. Cells Mater.*, vol. 4, pp. 1–17, 2002.
- [11] D. M. Brunette and B. Chehroudi, "The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo.," *J. Biomech. Eng.*, vol. 121, no. 1, pp. 49–57, Feb. 1999.
- [12] K. Wu, Y. Yang, Y. Zhang, J. Deng, and C. Lin, "Antimicrobial activity and



- cytocompatibility of silver nanoparticles coated catheters via a biomimetic surface functionalization strategy,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 7241–7252, 2015.
- [13] M. L. W. Knetsch and L. H. Koole, “New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 340–366, Jan. 2011.
  - [14] G. Gosheger *et al.*, “Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model—an analysis of the infection rate and toxicological side effects,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 24, pp. 5547–5556, Nov. 2004.
  - [15] S. Kim and D. Y. Ryu, “Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 78–89, Feb. 2013.
  - [16] C. Carlson *et al.*, “Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 43, pp. 13608–13619, Oct. 2008.
  - [17] W. Liu *et al.*, “Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size,” *Nanotoxicology*, vol. 4, no. 3, pp. 319–330, Sep. 2010.
  - [18] F. Barras, L. Aussel, and B. Ezraty, “Silver and antibiotic, new facts to an old story,” *Antibiotics*, vol. 7, no. 3. MDPI AG, 01-Sep-2018.
  - [19] V. Alt, “Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics—A clinical review and risk-benefit analysis,” *Injury*, vol. 48, no. 3, pp. 599–607, Mar. 2017.
  - [20] J. HARDES *et al.*, “Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 18, pp. 2869–2875, Jun. 2007.
  - [21] M. Rozenberg and G. Shoham, “FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range,” *Biophys. Chem.*, vol. 125, no. 1, pp. 166–171, Jan. 2007.
  - [22] E. Varoni *et al.*, “Effect of Poly-L-Lysine coating on titanium osseointegration: from characterization to in vivo studies,” *J. Oral Implantol.*, vol. 41, no. 6, pp. 626–631, Dec. 2013.
  - [23] J. H. Park, Z. Schwartz, R. Olivares-Navarrete, B. D. Boyan, and R. Tannenbaum, “Enhancement of surface wettability via the modification of microtextured titanium implant surfaces with polyelectrolytes,” *Langmuir*, vol. 27, no. 10, pp. 5976–5985, Jun. 2011.
  - [24] Y. Wang, R. Song, Y. Li, and J. Shen, “Understanding tapping-mode atomic force microscopy data on the surface of soft block copolymers,” *Surf. Sci.*, vol. 530, no. 3, pp. 136–148, May 2003.
  - [25] E. C. Cho, Q. Zhang, and Y. Xia, “The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 6, pp. 385–91, Apr. 2011.
  - [26] C. Y. Flores, A. G. Miñán, C. A. Grillo, R. C. Salvarezza, C. Vericat, and P. L.

- Schilardi, "Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 8, pp. 3149–3159, Apr. 2013.
- [27] Q. Wei and L. Z. Ma, "Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 10. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), pp. 20983–21005, Oct-2013.
  - [28] C. A. Gordon, N. A. Hodges, and C. Marriott, "Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *pseudomonas aeruginosa*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 22, no. 5, pp. 667–674, Nov. 1988.
  - [29] P. S. Stewart and J. W. Costerton, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms," *Lancet*, vol. 358, no. 9276. Elsevier Limited, pp. 135–138, 14-Jul-2001.
  - [30] M. Conte, F. Aliberti, L. Fucci, and M. Piscopo, "Antimicrobial activity of various cationic molecules on foodborne pathogens," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 12, pp. 1679–1683, Oct. 2007.
  - [31] G. A. Pankey and L. D. Sabath, "Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 6, pp. 864–870, Mar. 2004.
  - [32] J. Hasan, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials.," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, pp. 295–304, May 2013.
  - [33] M. Oćwieja, Z. Adamczyk, M. Morga, and K. Kubiak, "Influence of supporting polyelectrolyte layers on the coverage and stability of silver nanoparticle coatings," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 445, no. December 2015, pp. 205–212, 2015.
  - [34] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, "Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver," *Nanoscale*, vol. 5, no. 16, pp. 7328–7340, 2013.
  - [35] S. Eckhardt, P. S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, and K. M. Fromm, "Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine," *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)*, vol. 113, no. 7, pp. 4708–4754, 2013.
  - [36] C. Hadjicharalambous, C. Flouraki, R. Narain, M. Chatzinikolaidou, and M. Vamvakaki, "Controlling pre-osteoblastic cell adhesion and spreading on glycopolymer brushes of variable film thickness," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 7, Jul. 2018.
  - [37] N. Alam *et al.*, "The integrin—growth factor receptor duet," *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, no. 3, pp. 649–653, Dec. 2007.
  - [38] S. Chen *et al.*, "Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 164. Elsevier B.V., pp. 58–69, 01-Apr-2018.



- [39] C. S. Chen, J. L. Alonso, E. Ostuni, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber, "Cell shape provides global control of focal adhesion assembly," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 307, no. 2, pp. 355–361, Jul. 2003.



# Capítulo 7: Implantes funcionalizados con AgNPs.

Caracterización fisicoquímica y  
actividad antimicrobiana.

*“Sólo sirven las conquistas científicas sobre la salud si éstas son accesibles al  
pueblo” Ramón Carrillo*



## **7.1 Introducción**

### **7.1.1 Infecciones asociadas a implantes: prevalencia y consecuencias**

Aún no se ha encontrado una solución definitiva para las infecciones asociadas a implantes. Particularmente, las infecciones espinales representan entre 2-7% del total de las infecciones músculo-esqueléticas, con una distribución bimodal en la edad de los pacientes, con un pico a los 20 años y otro entre 50 y 70 años de edad [1]. Existen varios factores de riesgo que predisponen al paciente a la infección, como diabetes, sobrepeso, falla renal, presencia de catéteres intravenosos, cirugías espinales previas, diálisis, etc. La incidencia varía entre 1:20000 y 1:100000, y al 2016 registraron una tasa de mortalidad entre 2 y 20% en países desarrollados [2], [3], que se ha incrementado en los últimos años [3]. Este incremento puede deberse, por un lado, al mejoramiento de las tecnologías de diagnóstico, al aumento de pacientes adultos mayores con enfermedades crónicas, o bien, al incremento en el número de cirugías espinales, entre otras causas.

Las infecciones asociadas a implantes que se desencadenan luego de una cirugía espinal son las más problemáticas y aun no se encontraron soluciones certeras. En los casos más graves, el tratamiento con antibióticos de rutina es insuficiente en aproximadamente el 50% de los pacientes, siendo inevitable un procedimiento quirúrgico para el reemplazo de la prótesis infectada, una artroplastía o hasta la amputación del miembro, dependiendo de la severidad de los síntomas. Por otro lado, se sabe que los tejidos aledaños al biomaterial incorporado al organismo son más sensibles a infecciones tempranas o tardías [4], [5]. Tal como se mencionó en el Capítulo 1, el biofilm bacteriano formado en la superficie del material implantado es el factor más importante en el desarrollo de resistencia bacteriana, ya que forma una compleja barrera contra los antibióticos, y, por lo tanto, hace dificultoso el control de la infección [6]–[8].

En reuniones de trabajo del grupo con médicos especialistas en cirugía de columna, se describieron los procedimientos usuales ante la aparición de infección en el paciente instrumentado. La práctica habitual es realizar una cirugía de revisión en la que se lava la zona infectada (*toilette*) y se evalúa la estabilidad de los dispositivos implantados. En el caso de comprobar el aflojamiento del/los dispositivos o señales evidentes de la presencia de biofilms, se procede a su remoción, se realiza el tratamiento antimicrobiano y, una vez resuelta la infección, se coloca una nueva prótesis

en un segundo procedimiento quirúrgico. Parte del material retirado se envía al laboratorio del hospital para identificar el microorganismo y realizar el antibiograma. El resto del material se descarta adecuadamente en el quirófano.

Esta situación es indeseable tanto en términos de la calidad de vida del paciente como también de los costos en la financiación de la salud. El incremento de la utilización de implantes metálicos en cirugía vertebral, especialmente en la última década, ha traído consigo el aumento en las tasas de infecciones post operatorias. Los índices reportados para la incidencia de infecciones en cirugías en las que se emplea la profilaxis de rutina con antibióticos son de 1% en los casos donde no se usa un implante, mientras que se eleva a 2,1-8,5% cuando sí se utilizan [9], demostrando una fuerte correlación entre el uso de un dispositivo implantable y el desarrollo de una infección.

Por otro lado, en el caso de implantes dentales, una de las patologías más prevalentes es la peri-implantitis (inflamación alrededor de un implante dental caracterizada por pérdida del tejido circundante), alcanzando valores de hasta 22% en algunos países [10]. Salvi *et al.* publicaron un trabajo que muestra la predisposición a contraer infecciones periodontales aumenta en pacientes implantados, encontrando que en su mayoría, la presencia del implante se relaciona con un mayor tamaño de la zona infectada, y una destrucción mayor y más acelerada de tejido circundante al implante [11].

#### **7.1.2 Implantes recubiertos con Plata**

Trabajos previos realizados en el grupo [12], [13] mostraron que los implantes de titanio recubiertos con plata tienen características antibacterianas similares a las de la plata metálica pura. Además, estudios clínicos realizados por Devrim *et al.* [14] permitieron establecer que la plata no se acumula en órganos vitales, que no evidencia ningún efecto tóxico en estos tejidos y que los valores séricos de plata no se ven incrementados (datos obtenidos de estudios con implantes recubiertos con una cantidad de 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Ag). En este sentido, existen diferentes recomendaciones en cuanto a los niveles máximos de Ag que no presentan toxicidad. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud establece en un documento del 2018 que el nivel de efecto no adverso para la ingesta oral de plata es de 10 g en total de por vida [15], basándose en datos epidemiológicos y farmacocinéticos de casuística en humanos y animales. Además, se concluye que no existen evidencias de toxicidad aguda, y que un consumo de hasta 6,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal de AgNPs de 25-40 nm no ocasiona cambios

importantes en el metabolismo, ni altera los análisis de orina y la morfología de órganos [15]. Se considera que una carga total de 1g de plata en el cuerpo puede causar argiriosis, una enfermedad caracterizada por la coloración azulada o grisácea de la piel y otros órganos, sin otras consecuencias graves. Resultados experimentales *in vivo* en mamíferos concluyen que la exposición a este metal no tiene efecto tóxico [16], y en humanos se sugiere que las aplicaciones actuales de la plata, como iones, metal, o nanopartículas, no representa un riesgo [17].

La acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata es bien conocida y ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista científico-académico. Muchos de estos estudios incluyen el anclaje de las AgNPs sobre superficies de materiales poliméricos tales como silicona, latex, PEEK, utilizados en catéteres, sondas, líneas intravenosas, etc. No obstante, esta gran cantidad de estudios, sólo algunos productos fabricados con esos materiales y modificados con AgNPs han llegado al mercado médico. En el caso particular de implantes permanentes o temporarios fabricados con titanio o aleaciones, se ha identificado solamente una empresa a nivel global que fabrica y comercializa implantes realizados de aleación de titanio recubiertos con plata [18]. Sin embargo, como es de esperar, no se conoce cómo se incluye la plata en la superficie del material ni cuáles son los procedimientos para lograr el material modificado. Cabe destacar que esta empresa fabrica en serie dispositivos con medidas estándar y no ofrece productos fabricados a medida recubiertos con plata.

En el 2017, una empresa nacional que fabrica implantes, Implantes RB SRL, se contactó con el grupo con el fin de establecer colaboraciones para realizar mejoras en sus productos y otorgarles valor agregado. Para esto, se tuvieron en cuenta los antecedentes previos del grupo de trabajo en relación a la modificación de titanio con AgNPs y el presente trabajo de Tesis. Se establecieron convenios (CONICET: convenio de confidencialidad; UNLP: convenio para realizar desarrollos) desde el 2018 en colaboración entre el grupo y la empresa. Se incorporó al grupo de trabajo un equipo de médicos traumatólogos que brindaron toda la información necesaria sobre el procedimiento quirúrgico de colocación, seguimiento y reemplazo de prótesis o tornillos, así como también el tipo de materiales que se emplean actualmente en el país.

En este capítulo se describe, a modo de cierre, la aplicación de los conocimientos adquiridos en implantes de titanio en implantes provistos por la empresa. Los ensayos formaron parte de los requeridos por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) para permitir la comercialización de los

mismos. Al haberse establecido convenios que incluyen confidencialidad, solo algunos de los resultados obtenidos pueden ser mostrados en el contexto de esta Tesis, con autorización previa de las partes involucradas.

## 7.2 Análisis del efecto antimicrobiano en función del cubrimiento de AgNPs.

Con el propósito de optimizar el proceso de funcionalización y obtener superficies con las mejores propiedades antimicrobianas, se estudió, por un lado, el grado de cubrimiento logrado con diferentes tiempos de inmersión (como se mostró en el capítulo 4), y por otro lado, el efecto antimicrobiano de estos mismos sustratos frente a *S. aureus*, siguiendo el protocolo que se detalló en el Capítulo 3.

Los resultados de los análisis antimicrobianos se muestran en la figura 7.1, donde se puede observar que ambos tipos de AgNPs presentan actividad antimicrobiana aún cuando el cubrimiento es bajo (1 h de inmersión), siendo más efectivas las condiciones de 3 y 24 h de funcionalización, ya que no hay diferencias significativas entre el número de bacterias viables encontradas a estos tiempos.

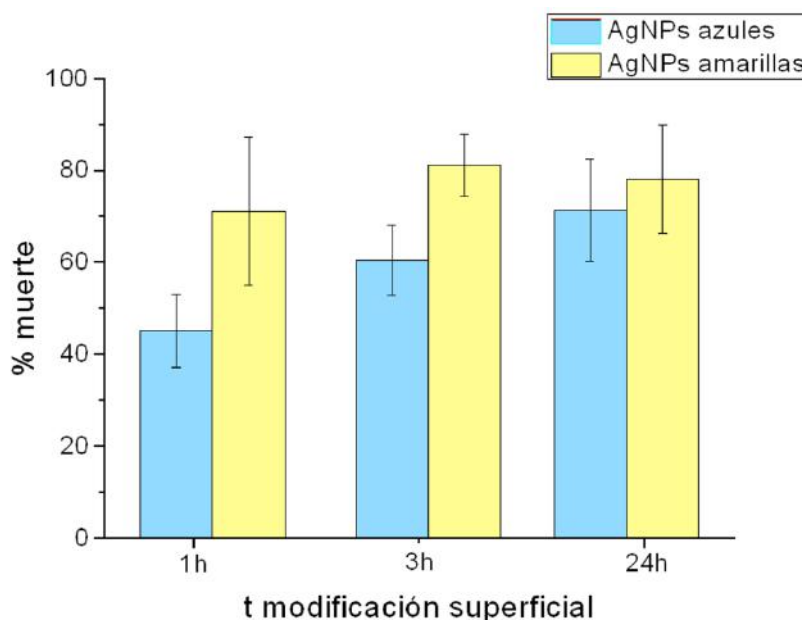


Figura 7.2: Gráfico del % de muerte de bacterias sésiles sobre sustratos de titanio modificados con AgNPs azules o amarillos en función del tiempo de modificación.



### 7.3 Funcionalización de tornillos y clavos endomedulares de titanio.

Para modificar las piezas se sigue el procedimiento desarrollado en el laboratorio (información confidencial). Estas piezas son previamente limpiadas siguiendo el protocolo estándar de la empresa, y luego de la modificación superficial se enjuagan con agua ultrapura para retirar el excedente de reactivos.

Las piezas utilizadas en los ensayos se muestran en la figura 7.2.

Se caracterizaron superficialmente muestras de tornillos funcionalizados y sin funcionalizar mediante AFM y XPS, comprobándose que las piezas contienen AgNPs adsorbidas (No se muestran datos).

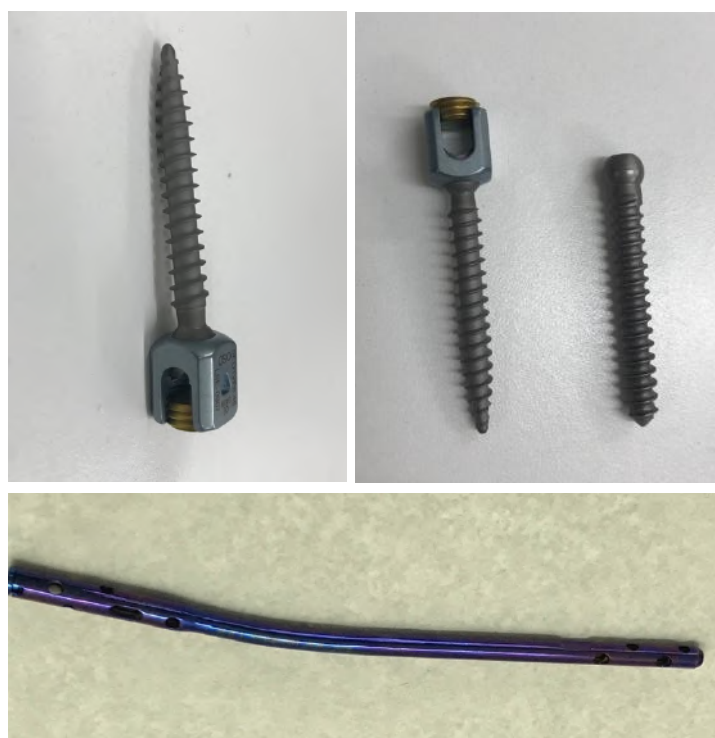


Figura 7.3: Fotografías de las piezas metálicas funcionalizadas con AgNPs. Arriba: Tornillos de titanio con tulipa anodizada y sin tulipa. Abajo: Clavo endomedular de titanio con un proceso de anodizado.

### 7.3.1 Estabilidad del recubrimiento

Se estudió la resistencia de las AgNPs adsorbidas en la superficie al proceso de esterilización. Para esto, se estudiaron 3 métodos de esterilización: óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrógeno, y autoclave. Se utilizó además una cuarta muestra como control sin esterilizar. Se determinó la presencia de las AgNPs mediante análisis químico de superficie (XPS) y se encontró que ni el plasma ni el óxido de etileno afectan considerablemente la funcionalización.

Asimismo, se determinó la estabilidad del recubrimiento durante un período de 8 meses de almacenamiento. Para esto se cuantificó la cantidad de plata superficial disolviendo las nanopartículas mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno y determinando la concentración de Ag total en la solución obtenida mediante un electrodo selectivo de iones  $\text{Ag}^+$ . Se encontró que la cantidad de plata determinada en los espaciadores almacenados corresponde al 92 % de la plata incorporada en los espaciadores recién recubiertos.

### 7.4 Análisis cuantitativo de liberación de $\text{Ag}^+$

Se estudió la liberación de  $\text{Ag}^+$  de tornillos de titanio como los que se muestran en la figura 7.2. El ensayo consistió en modificar con AgNPs los tornillos completos (tornillo, tulipa e inner) y posteriormente sumergirlos en agua ultrapura durante 3 h, 24 h y 72 h, respectivamente. Pasado ese tiempo, se tomaron alícuotas del medio acuoso y se analizó la cantidad de plata liberada en cada caso mediante espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Como control de Ag total se utilizaron tornillos modificados y luego tratados con peróxido de hidrógeno diluido para disolver las AgNPs de su superficie y se analizó por la misma técnica la cantidad de plata sobre la superficie del tornillo (plata inicial total). Los resultados se presentan como porcentaje de plata liberada respecto del control inicial en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1: porcentaje de  $\text{Ag}^+$  liberado por tornillo respecto del total inicial.

Tiempo	% $\text{Ag}^+$ liberada
3 h	$24 \pm 5$
24 h	$26 \pm 4$
72 h	$29 \pm 4$

#### 7.4.1 Liberación de $\text{Ag}^+$ a largo plazo

Se tomaron tornillos funcionalizados con AgNPs y se estudió la liberación de iones plata durante un total de 45 días en medio acuoso (agua Milli Q) a temperatura ambiente, en los que se cambió el agua luego de los primeros 15 días para evitar una saturación de la capacidad de disolución de las AgNPs. Paralelamente, se realizó el mismo estudio con tornillos funcionalizados con PLL y AgNPs a modo comparativo. El tiempo total del ensayo fue de 45 días, y los resultados se muestran en la figura 7.3, donde se observa que desde el inicio la cantidad de plata liberada es mayor en el caso de tornillos funcionalizados con PLL y AgNPs (rombos amarillos), como era de esperarse según los resultados del capítulo 6. Además, se aprecia que los tornillos modificados solamente con AgNPs (triángulos lilas) agotan su capacidad de liberación de iones antes que los que están modificados con PLL y AgNPs: luego de 7 días con agua nueva los valores son muy bajos, de 0,02 ppm que equivalen a 0,02  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Ag}^+$  (triángulos fucsias), mientras que los de PLL siguen liberando hasta pasados los 30 días en total, lo cual es esperado ya que estos últimos tienen mayor cantidad de AgNPs (círculos naranjas).

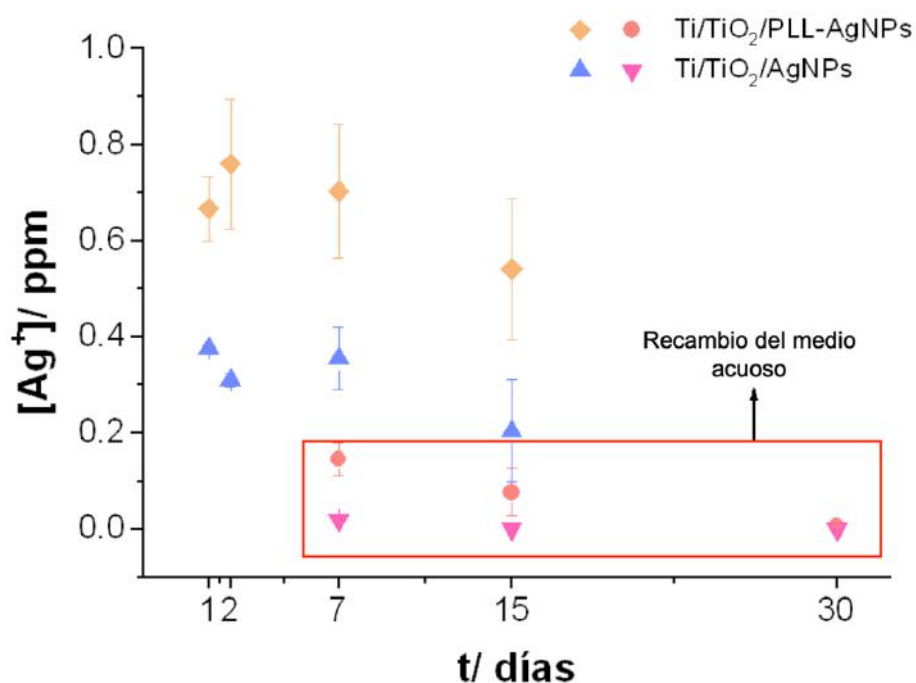


Figura 7.4: cantidad de iones  $\text{Ag}^+$  liberados de los tornillos modificados en función del tiempo. Luego de los primeros 15 días se renovó el medio acuoso y se monitoreó la  $[\text{Ag}^+]$  durante otros 30 días

La cantidad total de plata liberada en el tiempo del ensayo fue de  $15,6 \pm 3 \mu\text{g}$  ( $\approx 3 \text{ ppm}$ ) para los tornillos modificados con PLL y AgNPs y de  $7,8 \pm 1,2 \mu\text{g}$  ( $\approx 1,5 \text{ ppm}$ ) para aquellos recubiertos solamente con AgNPs. Estos valores son acordes a los porcentajes expresados anteriormente y representan cantidades muy por debajo de las reportadas en la bibliografía como citotóxicas (10-15 ppm) [19], [20].

### **7.5 Análisis de la capacidad antimicrobiana de los dispositivos modificados**

Se analizaron las propiedades antimicrobianas de las piezas funcionalizadas y sin funcionalizar. Para esto, se realizaron ensayos de viabilidad de *S. aureus* y *P. aeruginosa* a 3 h, 24 h, y 72 h, siguiendo un protocolo similar al descrito en el Capítulo 3. Se utilizaron estos microorganismos porque se encuentran entre los principales agentes involucrados en las infecciones del sitio quirúrgico, según el Documento Final de Consenso Interinstitucional “Actualización Sobre Medidas de Prevención de Infecciones de Sitio Quirúrgico” [21].

Los resultados se muestran en la figura 7.4, donde se representa el % de muerte bacteriana y el correspondiente % de plata liberada (datos Tabla 7.2). Por otro lado, los análisis antimicrobianos muestran una reducción de un 80-90% en el número de bacterias adheridas al material funcionalizado, en concordancia con los trabajos publicados previamente por el grupo [13], [22], [23].

Particularmente, para ambos microorganismos se observa un aumento del % de muerte a medida que el tiempo de contacto con la superficie modificada se incrementa, lo que indica que, si bien la cantidad de plata liberada no aumenta, su efecto es sostenido en el tiempo.

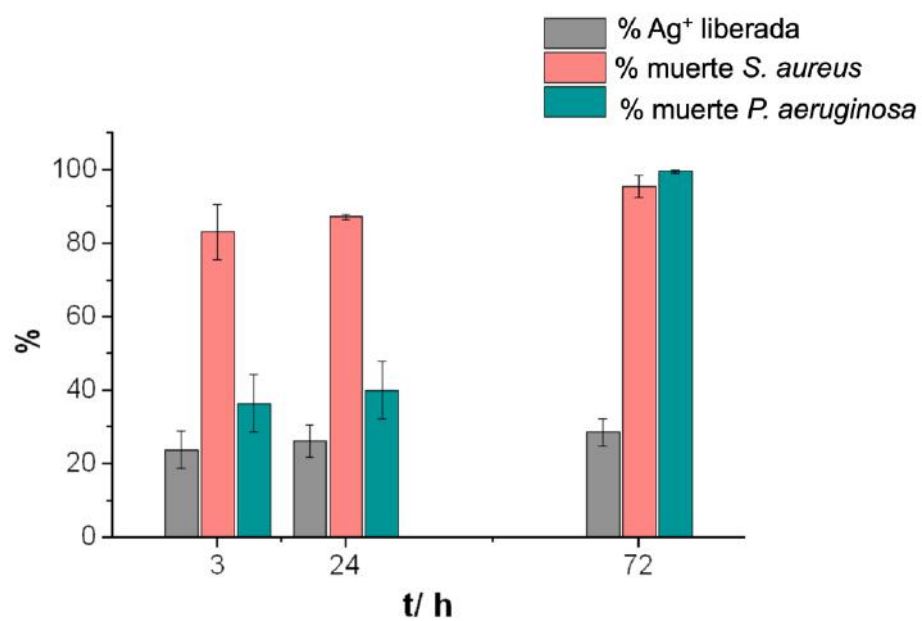


Figura 7.5: % de Ag<sup>+</sup> liberada respecto de la cantidad de plata total, y % de muerte bacteriana respecto de la cantidad de bacterias iniciales para *S. aureus* y *P. aeruginosa*

## 7.6 Conclusiones

Se logró funcionalizar piezas de titanio a gran escala (tornillos, barras, espaciadores) con AgNPs sintetizadas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Para esto fue necesaria la producción de grandes cantidades de dispersión coloidal, que fueron periódicamente evaluadas en cuanto a su estabilidad y concentración. Las nanopartículas sintetizadas y la metodología de funcionalización desarrollada permite la posterior esterilización de los dispositivos mediante los métodos comúnmente utilizados en la industria, conservando el recubrimiento de plata aún luego de varios meses de almacenamiento.

Se demostró que las piezas modificadas son capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, resultando en un efecto bacteriostático sostenido en el tiempo.

Por otro lado, de acuerdo con los ensayos de liberación de plata en medio acuoso, se concluye que la misma no se libera de forma masiva, sino progresivamente a una velocidad aproximada de 10  $\mu\text{g}/\text{día}$  (cálculo para 10 tornillos). Este valor está dentro de la cantidad de plata que incorpora una persona normal en su dieta diaria. Teniendo en cuenta que la excreción de iones plata en humanos y otros mamíferos se encuentra entre el 90% y 99% [16], la cantidad de plata que pueda ser incorporada por el organismo desde un implante modificado no constituye un riesgo de argiria para los pacientes.

Los ensayos de citotoxicidad, realizados en otra institución según normas ISO, clasifican a las piezas modificadas con AgNPs como no citotóxicas. La modificación superficial no altera las propiedades del material masivo (biocompatibilidad, dureza, densidad, etc.) que lo hacen apropiado para ser implantado.

El aspecto más importante de la metodología desarrollada, reside en que, gracias a su versatilidad y sencillez, permite su aplicación en dispositivos prescriptos por el cirujano ortopédico como producto a medida y que son fabricados *ad hoc* según las necesidades particulares de cada paciente.

## 7.7 Bibliografía

- [1] S. Lener, S. Hartmann, G. M. V Barbagallo, F. Certo, C. Thomé, and A. Tschugg, 'Management of spinal infection: a review of the literature.', *Acta Neurochir. (Wien)*., vol. 160, no. 3, pp. 487–496, 2018.
- [2] A. W. Artenstein, J. Friderici, A. Holers, D. Lewis, J. Fitzgerald, and P. Visintainer, 'Spinal Epidural Abscess in Adults: A 10-Year Clinical Experience at a Tertiary Care Academic Medical Center.', *Open forum Infect. Dis.*, vol. 3, no. 4, p. ofw191, Oct. 2016.
- [3] T. Aagaard, C. Roed, B. Dahl, and N. Obel, 'Long-term prognosis and causes of death after spondylodiscitis: A Danish nationwide cohort study', *Infect. Dis. (Auckl)*., vol. 48, no. 3, pp. 201–208, Mar. 2016.
- [4] F. J. Schwab, D. G. Nazarian, F. Mahmud, and C. B. Michelsen, 'Effects of Spinal Instrumentation on Fusion of the Lumbosacral Spine', *Spine (Phila. Pa. 1976)*., vol. 20, no. 18, pp. 2023–2028, Sep. 1995.
- [5] J. M. Schierholz and J. Beuth, 'Implant infections: a haven for opportunistic bacteria', *J. Hosp. Infect.*, vol. 49, no. 2, pp. 87–93, Oct. 2001.
- [6] J. S. VanEpps and J. G. Younger, 'Implantable Device-Related Infection', *SHOCK*, vol. 46, no. 6, pp. 597–608, Dec. 2016.
- [7] W. Zimmerli and P. Sendi, 'Orthopaedic biofilm infections', *APMIS*, vol. 125, no. 4, pp. 353–364, Apr. 2017.
- [8] J. W. Costerton, L. Montanaro, and C. R. Arciola, 'Biofilm in implant infections: its production and regulation.', *Int. J. Artif. Organs*, vol. 28, no. 11, pp. 1062–8, Nov. 2005.
- [9] K. Devrim Seçinti, A. Attar, and E. Seçinti, 'Clinical Trail Using A Silver-Coated Screw-Rod System and One-Year Follow-Up of The First 50 Patients', *Sinir Sist. Cerrahisi Derg.*, vol. 6, pp. 10–21, 2018.
- [10] J. Mir-Mari, P. Mir-Orfila, R. Figueiredo, E. Valmaseda-Castellón, and C. Gay-Escoda, 'Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment', *J. Clin. Periodontol.*, vol. 39, no. 5, pp. 490–494, 2012.
- [11] G. E. Salvi, R. Cosgarea, and A. Sculean, 'Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases', *J. Dent. Res.*, vol. 96, no. 1, pp. 31–37, Jan. 2017.
- [12] C. Y. Flores, A. G. Miñán, C. A. Grillo, R. C. Salvarezza, C. Vericat, and P. L. Schilardi, 'Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 8, 2013.
- [13] C. Y. Flores *et al.*, 'Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*', *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 350, no. 2, pp. 402–408, 2010.

- [14] K. D. Secinti, M. Ayten, G. Kahilogullari, G. Kaygusuz, H. C. Ugur, and A. Attar, 'Antibacterial effects of electrically activated vertebral implants', *J. Clin. Neurosci.*, vol. 15, no. 4, pp. 434–439, Apr. 2008.
- [15] WHO, *Silver as a drinking-water disinfectant*. 2018.
- [16] L. Fewtrell, 'Silver : water disinfection and toxicity', *WHO, World Heal. Organ.*, p. 53, 2014.
- [17] S. Chernousova and M. Epple, 'Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal', *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 52, no. 6. pp. 1636–1653, 04-Feb-2013.
- [18] 'Norm Medical Spinal & Trauma Implant'. [Online]. Available: <https://www.normltd.net/>. [Accessed: 11-Feb-2020].
- [19] M. Milić *et al.*, 'Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells', *J. Appl. Toxicol.*, vol. 35, no. 6, pp. 581–592, Jun. 2015.
- [20] A. Katsumiti, D. Gilliland, I. Arostegui, and M. P. Cajaraville, 'Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells', *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0129039, 2015.
- [21] Ministerio de Salud Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Instituto Nacional de Epidemiología (INE) Sociedad Argentina de Infectología (SADI)., 'Documento Final de Consenso Interinstitucional "Actualización Sobre Medidas de Prevención de Infecciones de Sitio Quirúrgico"', 2015.
- [22] F. Ghilini *et al.*, 'Highly Stabilized Nanoparticles on Poly- L-Lysine-Coated Oxidized Metals: A Versatile Platform with Enhanced Antimicrobial Activity', *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 28, pp. 23657–23666, Jul. 2018.
- [23] D. E. Pissinis, G. A. Benítez, and P. L. Schilardi, 'Two-step biocompatible surface functionalization for two-pathway antimicrobial action against Gram-positive bacteria', *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 164, pp. 262–271, Apr. 2018.



# Conclusiones finales:



Al comenzar este trabajo, se partió de la hipótesis que la funcionalización de superficies con biomoléculas permite mejorar el desempeño de los materiales implantables y así regular la interacción de éstos con el medio biológico. Se propuso como objetivo diseñar estrategias para la inmovilización de biomoléculas sobre superficies que conduzcan a la inhibición de la formación de biofilms y una mejor interacción con los tejidos. A partir de esta premisa, se estudiaron los siguientes sistemas: nanopartículas de plata modificadas con Lf y superficies de titanio multifuncionalizadas con AgNPs y biomoléculas. Se utilizaron dos biomoléculas distintas: por un lado un homo-polímero catiónico formado por aminoácidos (PLL) y por otro una proteína láctea con actividad antimicrobiana (Lf).

En una primera instancia se probó la funcionalización directa de AgNPs con Lf, con el objetivo de potenciar la acción antimicrobiana de las nanopartículas. Se logró inmovilizar la proteína sobre la superficie de AgNPs azules, obteniéndose una dispersión estable a pH neutro, pudiendo ser mantenidas en dispersión acuosa durante varias semanas. Por otro lado, las AgNPs-Lf en dispersión poseen un efecto antimicrobiano similar a las AgNPs sin modificar frente a bacterias planctónicas, sin evidenciarse efectos sinérgicos o aditivos entre ambos agentes.

Se prepararon superficies multi-componente, Lf y AgNPs, a partir de la doble funcionalización de sustratos de titanio. La adsorción de las AgNPs se produce a partir de la interacción de los grupos carboxilo del recubrimiento de citrato con los grupos –OH del óxido nativo presente en la superficie Ti/TiO<sub>2</sub>. La adsorción de Lf en sustratos con AgNPs se produce a través de interacciones electrostáticas con posibles contribuciones de interacciones dipolares, evidenciadas en esta tesis a partir del estudio mediante XPS de la superficie Ti/TiO<sub>2</sub>/Lf/AgNPs, en la que se evidencia la especie C-SS-C presente en la estructura primaria de la proteína y no se observan enlaces del tipo S-Ag propios de la quimisorción de especies azufradas.. Estos sustratos multifuncionalizados poseen una capacidad antimicrobiana similar a aquellos modificados solamente con AgNPs. Sin embargo, su biocompatibilidad es notablemente superior a los que no contienen Lf, demostrada a través de altos niveles de adhesión y viabilidad de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. Fundamentalmente, estas superficies multi-componente mostraron la mayor capacidad osteorregeneradora, medida en términos de la mineralización y diferenciación celular.

Por otro lado, se estudió la adsorción de AgNPs sobre titanio mediada por una capa de PLL. Se logró la adsorción directa de PLL sobre Ti/TiO<sub>2</sub>, proporcionando así

una carga superficial positiva adecuada para la incorporación de AgNPs citratadas negativamente cargadas. La capa de PLL influye en la adsorción de AgNPs tanto amarillas como azules al (i) aumentar la cantidad de plata inmovilizada, (ii) promover la adsorción de AgNPs individuales y (iii) impedir la formación de agregados de AgNPs. El efecto antibacteriano de las superficies Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs es mayor que el correspondiente a las Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs, tanto contra *S. aureus* (Gram +) como *P. aeruginosa* (Gram-), considerando que la disminución el número de bacterias viables alcanza la condición bactericida para ambas cepas y ambas AgNPs, amarillas y azules. Estos resultados son extremadamente importantes en el contexto de superficies funcionalizadas, ya que la acción antimicrobiana depende de la concentración superficial del agente microbicida, la que generalmente es lo suficientemente baja como para inhibir la adhesión y/o proliferación bacteriana (efecto bacteriostático) pero no lo suficientemente alta como para alcanzar la condición bactericida. En este sentido, las superficies Ti/TiO<sub>2</sub>/PLL-AgNPs son capaces de disminuir la viabilidad bacteriana más de 5 órdenes con respecto al inóculo bacteriano inicial, lo que significa que una carga relativamente baja de AgNPs logra el 99.999% de muerte bacteriana después de 24 h. Además, esta superficie no sólo evita la proliferación bacteriana, sino que es capaz de matar a la mayoría de las bacterias inicialmente adheridas a la superficie. El análisis de la adhesión y proliferación de células pre-osteoblásticas indica una buena biocompatibilidad, la que está probablemente relacionada con dos características importantes del sistema estudiado: las AgNPs están fuertemente ancladas al sustrato, lo que evita la potencial citotoxicidad por internalización de las nanopartículas, y se produce una liberación lenta de una cantidad relativamente baja de iones Ag<sup>+</sup> que no ocasiona daño celular.

De esta forma se pudieron desarrollar sustratos de titanio modificados capaces de prevenir la formación de biofilms sin ocasionar efectos citotóxicos, con potencialidad para ser utilizadas como nuevos materiales en dispositivos biomédicos. Las superficies desarrolladas tienen funciones diferentes: las Ti/TiO<sub>2</sub>/AgNPs/Lf son, además de antimicrobianas, promotoras de la adhesión y regeneración celular, por lo que pueden ser indicadas para aquellos casos en los que se requiere de la fijación de la prótesis al hueso. Las superficies funcionalizadas con PLL y AgNPs tienen propiedades bactericidas y una buena biocompatibilidad, por lo que estas serían mas convenientes a la hora de tratar un paciente con riesgos de infección, donde la fijación del implante no es lo primordial.

Se realizó el escalado de la metodología desarrollada para la adsorción directa de AgNPs sobre titanio y se aplicó a implantes de titanio de distinta forma y tamaño. Se llevaron a cabo ensayos que permitieron concluir que el recubrimiento de nanopartículas es estable frente a la esterilización, permitiendo el almacenamiento de las piezas por varios meses sin que se altere la cantidad de Ag incorporada. Las piezas modificadas mostraron tener capacidad antimicrobiana, a la vez que los ensayos de citotoxicidad, realizados en otra institución según normas ISO, clasifican a las piezas modificadas con AgNPs como no citotóxicas.

El aspecto más importante de la metodología desarrollada, reside en que, gracias a su versatilidad y sencillez, permite su aplicación en dispositivos prescritos por el cirujano ortopédico como producto a medida y que son fabricados *ad hoc* según las necesidades particulares de cada paciente. Los dispositivos de titanio modificados pueden ser utilizados de manera preventiva o como estrategia terapéutica. La acción preventiva es adecuada para pacientes con elevado riesgo de infección debido a factores tales como diabetes, obesidad, adicciones, inmunosupresión, etc. En el caso de clavos endomedulares, es apropiado además como tratamiento preventivo en el caso de fracturas expuestas. El objetivo es disminuir la incidencia de infección. La acción terapéutica de los tornillos, clavos, etc. recubiertos con AgNPs es oportuna en el caso de infección por instrumentación previa, donde se retiran los dispositivos originalmente implantados e infectados, se controla la infección y por inestabilidad residual se reinstrumenta con dispositivos modificados. Asimismo, como tratamiento para pacientes con infección postoperatoria que deben preservar el pedículo durante el tratamiento con antibióticos pueden colocarse espaciadores con AgNPs para ayudar a resolver la infección. El efecto bacteriostático producido por las AgNPs presentes en la porción pedicular y extrapedicular del dispositivo complementa la acción de los antibióticos administrados por vía sistémica y la *toilette* quirúrgica (lavado) con limpieza mecánica.

La transferencia al sector productivo del desarrollo de implantes recubiertos con AgNPs demostró que es posible aplicar los conocimientos generados a partir de la investigación básica. Estos productos de origen nacional, contienen un importante valor agregado y confieren competitividad a empresas del país frente a las extranjeras. Los desarrollos fueron realizados íntegramente a partir de investigaciones solventadas con recursos nacionales y con la colaboración de organismos como CONICET, ANPCyT y la UNLP, afianzando la idea que las investigaciones científicas son fundamentales para el desarrollo de un país independiente y soberano.



## Apéndice 1

Esta tesis dio lugar a las publicaciones y premios detallados a continuación:

- 1) *Ghilini, F.; Pissinis, D., Miñán, A. G., Schilardi, P. L. & Diaz, C.* (2019) **How Functionalized Surfaces Can Inhibit Bacterial Adhesion and Viability**. ACS Biomaterials Science & Engeneering. 5(10), 4920–4936. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00849>.
- 2) *Ghilini, F., Rodríguez González, M. C., Miñán, A. G., Pissinis, D., Creus, A. H., Salvarezza, R. C., & Schilardi, P. L.* (2018). **Highly Stabilized Nanoparticles on Poly-L-Lysine-Coated Oxidized Metals: A Versatile Platform with Enhanced Antimicrobial Activity**. ACS Applied Materials & Interfaces, 10(28), 23657–23666. doi:10.1021/acsami.8b07529
- 3) *Ghilini Fiorela,* **Funcionalización de superficies con Lactoferrina Bovina**. Revista Investigación joven, UNLP ISBN: 2314-3991
- 4) Mención de Honor a la Innovación UNLP 2019: **Materiales implantables recubiertos con Nanopartículas de Plata como plataforma para la prevención y control de infecciones. (Grupo NanosBio).**

En redacción:

**Antimicrobial multifunctional surfaces with enhanced biocompatibility: AgNPs and Lf on titanium.**